

**Lokalisation von Sex Hormone-Binding Globulin
im Gehirn der Maus
Colokalisation mit Estrogen Rezeptor α im Mausgehirn**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Anika Winter
geboren am 07.04.1978 in Northeim.

Erster Gutachter _____

Zweiter Gutachter: _____

Dritter Gutachter _____

Tag der öffentlichen Verteidigung: _____

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABP	Androgen-Binding Protein
AK	Antikörper
CA	Cornu ammonis
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzol
ER	Estrogenrezeptor
FR	Formatio reticularis
h	Stunde
kDa	Kilodalton
LS	Limbisches System
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mMol	Milimol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
n.	nervi
Ncl.	Nucleus
ncl.	nucleuli
Ncll.	Nuclei
PAG	Periaqueductales Grau
PBS	Phosphatpuffer
pH	pondus Hydrogenii
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SBP	Sex Steroid-Binding Protein
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin
SSBG	Sex Steroid-Binding Protein
TeBG	Testosteron Estrogen-Binding Globulin
VHM	Ncl. ventromedialis hypothalamii
ZNS	Zentralnervensystem

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Sex hormone-binding Globulin (SHBG).....	3
2.1.1	<i>Struktur</i>	<i>4</i>
2.1.2	<i>Funktion und Regulierung.....</i>	<i>5</i>
2.1.3	<i>Klinische Relevanz.....</i>	<i>7</i>
2.1.4	<i>SHBG im Gehirn: Lokalisation und funktionelle Bedeutung.....</i>	<i>8</i>
2.2	Estrogene	8
2.2.1	<i>Wirkungsweise von Estrogenen</i>	<i>9</i>
2.2.2	<i>Estrogenrezeptoren.....</i>	<i>10</i>
2.2.3	<i>Estrogene im Gehirn.....</i>	<i>11</i>
3	Ziele der Arbeit und Fragestellung.....	13
4	Material und Methoden.....	14
4.1	Versuchstiere	14
4.2	Immunzytochemie.....	14
4.2.1	<i>SHBG -Färbung</i>	<i>14</i>
4.2.2	<i>Fluoreszenzdoppelfärbung für SHBG und ER α</i>	<i>15</i>
4.3	Mikroskopische Auswertung und Dokumentation.....	16
5	Ergebnisse	17
5.1	Lokalisation von SHBG – Zelluläre Beschreibung	17
5.2	Lokalisation von SHBG - Morphologische Beschreibung	17
5.2.1	<i>Bulbus olfactorius.....</i>	<i>17</i>
5.2.2	<i>Neocortex</i>	<i>19</i>
5.2.3	<i>Basalganglien.....</i>	<i>20</i>
5.2.4	<i>Septum.....</i>	<i>23</i>
5.2.5	<i>Hippocampus und Allocortex.....</i>	<i>24</i>
5.2.6	<i>Thalamus.....</i>	<i>26</i>
5.2.7	<i>Hypothalamus</i>	<i>27</i>
5.2.8	<i>Tectum.....</i>	<i>32</i>
5.2.9	<i>Tegmentum.....</i>	<i>34</i>
5.2.10	<i>Motorische Hirnnervenkerne</i>	<i>36</i>
5.2.11	<i>Sensorische Hirnnervenkerne</i>	<i>38</i>
5.2.12	<i>Sensible Hirnnervenkerne.....</i>	<i>40</i>
5.2.13	<i>Olivenerne</i>	<i>42</i>

5.2.14	<i>Brückenkerne</i>	43
5.2.15	<i>Formatio reticularis</i>	45
5.2.16	<i>Cerebellum</i>	46
5.3	Lokalisation von SHBG – schematische Darstellung	49
5.4	Colokalisation von SHBG und ER ?	52
6	Diskussion.....	54
6.1	SHBG im Gehirn.....	54
6.2	Lokalisation von SHBG im Gehirn und Überlegungen zu seiner Funktion	55
6.2.1	<i>Limbisches System</i>	55
6.2.2	<i>Hypothalamus</i>	57
6.2.3	<i>Hirnstammfunktionen</i>	60
6.2.4	<i>Cortex</i>	63
6.2.5	<i>Cerebellum</i>	65
6.3	Colokalisation von SHBG mit ER a	66
6.4	Überlegungen zum Wirkungsgefüge von SHBG und ER a im Gehirn	68
7	Schlussfolgerung	70
8	Literaturübersicht.....	71
9	Lebenslauf.....	83
10	Danksagung	85
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	86

1 Zusammenfassung

Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) ist als Bindungsprotein im Blutplasma für Steroidhormone wie Estrogen und Testosteron bekannt. Die Produktionsstätte des Proteins wurde zunächst in der Leber lokalisiert. Spätere Untersuchungen wiesen in verschiedenen Spezies die intrinsische Produktion von SHBG in mehreren Zielorganen für Steroide nach, so auch im Zentralen Nervensystem (ZNS). Die Funktion des Bindungsproteins im Gehirn ist sehr wenig bekannt. Einige Daten lassen vermuten, dass es möglicherweise an einer nicht-genomischen Wirkweise von Steroiden an der Zellmembran beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels immunzytochemischer Methoden eine detaillierte Lokalisationsstudie von SHBG für das Gehirn der Maus zu erstellen. Um weitere funktionelle Beweise für ein autonomes SHBG-Steroid Wirkungssystem zu finden, wurde die Kolo-kalisation von SHBG mit dem klassischen Steroidrezeptor, Estrogenrezeptor α , für das gesamte Mausgehirn untersucht.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Vibratomschnitte von den Gehirnen zuvor kardial perfundierter Mäuse hergestellt und erprobte hochspezifische polyklonale Antikörper verwendet.

Die Verteilung von SHBG im Mausgehirn wurde in der vorliegenden Arbeit fotografisch, tabellarisch und schematisch dokumentiert.

Spezifische Immunreaktivität für SHBG konnte in zahlreichen Gehirnarealen der Maus nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich sowohl Zellkörper als auch Zellausläufer gefärbt. Die SHBG-enthaltenden Areale deckten sich nur selten mit bekannten anatomischen Strukturen, vielmehr waren jeweils Teilgebiete bekannter Kerne oder Strukturen positiv für SHBG.

So deutet das Vorkommen von SHBG in der präoptischen Region und im Hippocampus auf eine Funktion im limbischen System hin. Hier deckt sich die SHBG-Lokalisation nur teilweise mit der Lokalisation klassischer Estrogenrezeptoren.

SHBG in den magnozellulären hypothalamischen Kernen hat wahrscheinlich Zugang zum Hypothalamo-neurohypophysären System. Hinweise für eine SHBG Sekretion vom Hinterlappen konnten in früheren Arbeiten gefunden werden. Es ist bekannt, dass die hypothalamische SHBG- Expression Estrogen-abhängig ist.

Die Lokalisation von SHBG in der Innenzone des Eminentia mediana ist Hinweis auf eine Funktion im Hypothalamo-adenohypophysären System.

SHBG ist innerhalb des Hirnstammes sowohl in sensorischen, motorischen und sensiblen Systemen als auch in den das vegetative Nervensystem steuernden Strukturen vertreten. Möglicherweise fungiert SHBG hier zum einen als ein autonomer Neurotransmitter und zum anderen als Neuromodulator von bekannten Estradiol Wirkungen auf die verschiedenen Systeme.

Im Bulbus olfactorius und Tuberculum olfactorium nachgewiesenes SHBG weist auf eine Funktion bei der olfaktorischen Wahrnehmung hin.

In früheren Studien wurde der Einfluss von SHBG auf die Motorik beschrieben. Die Lokalisation von SHBG im Cerebellum gibt Hinweis auf die Art und Weise der Einflussnahme.

Immunzytochemische Doppelfärbung von SHBG mit Estrogenrezeptor α zeigte, dass SHBG sowohl unabhängig als auch gemeinsam mit dem klassischen Estrogenrezeptor in denselben Gebieten vorkommen kann. Allerdings zeigte sich eine intrazelluläre Colokalisation der beiden Proteine ausschließlich in dem parvocellulären ventromedialen Hypothalamus. Diese Ergebnisse bringen weitere Hinweise auf eine vom Steroidrezeptor unabhängige, membranständige Wirkweise von Steroiden im Gehirn.

Die mögliche funktionelle Bedeutung der Colokalisation von SHBG mit Estrogenrezeptor α im parvocellulären Hypothalamusbereich benötigt weiterführende Untersuchungen.

Die Expression von SHBG in verschiedenen Gehirnarealen weist darauf hin, dass SHBG an der Steuerung von zahlreichen physiologischen Prozessen (von der Reproduktion bis zum Limbischen System) teilnimmt. Die Lokalisation von SHBG in unterschiedlichen Zelltypen (Interneurone, neurosekretorische Zellen) unterstützt die Vermutungen über die multiple zelluläre Wirkungsweise von SHBG. Es ist denkbar, dass SHBG sowohl als Neurohormon, Neurotransmitter, Releasingfaktor als auch als parakrin wirksamer Faktor bedeutsam ist.

2 Einleitung

2.1 Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)

Im Plasma der meisten Säugetiere (mit der Ausnahme von ausgewachsenen Ratten und Mäusen), Reptilien und Amphibien befinden sich verschiedene Sexualhormonbindende- oder Transporter-Proteine. Zu ihnen gehört das Sex Hormone-Binding Globulin, auch bekannt als Sex Steroid-Binding Protein (SBP), Testosteron Estrogen-Binding Globulin (TeBG) oder Sex Steroid-Binding Globulin (SSBG).

SHBG wurde 1965 zum ersten Mal aus dem Plasma isoliert (Rosenbaum et al. 1966), und war funktionell vorerst hauptsächlich durch seine hohe Bindungsaffinität und -spezifität für Estrogene (Rosenbaum et al. 1966) und Androgene (Kato und Horton 1968) bekannt.

SHBG-kodierende Gene wurden bei der Maus auf dem Chromosom 11 (Joseph et al. 1991), bei der Ratte auf dem Chromosom 10 (Joseph et al. 1991) und für den Menschen auf dem Chromosom 17, Region P12-13 (Hammond et al. 1989, Gershagen et al. 1989) lokalisiert.

Nachdem zunächst die Leber als einziger Expressionsort des SHBG galt, wurde 1973 ein hodenspezifisches Homolog, das Adrogen-Binding Protein (ABP), identifiziert, das in den Sertolizellen produziert und sezerniert wird (Hansson et al. 1976). Beide Proteine haben die identische Aminosäuresequenz (Sullivan et al. 1991) und unterscheiden sich lediglich in ihren Kohlenhydratanteilen (Cheng et al. 1985, Danzo et al. 1991). Immunochemische und strukturelle Studien mit humanen ABP und SHBG sowie dem von Ratten haben gezeigt, dass SHBG und ABP chemisch nahezu nicht unterscheidbar sind (Joseph et al. 1987). Außerdem scheint die unterschiedliche Glykolisierung keinen entscheidenden Einfluss auf die Steroidbindungsfähigkeit zu haben (Bocchinfuso et al. 1992). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Begriff SHBG verwandt.

In Studien an für humanes SHBG transgenen Mäusen wurde die Expression von SHBG im Pars contorta des proximalen Nierentubulus, in den Sertolizellen und im duodenalen Epithel (Janne et al. 1998, 1999) beschrieben. Außerdem gibt es Beobachtungen über SHBG-Expression im Rattengehirn, in der menschlichen Placenta und im Endometrium, in Ovarial-, Endometrium- und Brustkrebszellen sowie verschiedenen kultivierten menschlichen Krebszellen (Petrusz 2002). Die lokale Produktion von SHBG wurde für verschiedene Spezies im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt, den Epididymis ausgenommen, nachgewiesen (Joseph 1994). Auch im Gehirn ist die Expression von SHBG nachgewiesen (Wang et al. 1990) (Details siehe unter 2.1.4.).

Unterschiedlich gesplicete Varianten von SHBG werden im menschlichen Hoden (Gershagen et al. 1989, Selva et al. 2002), verschiedenen Geweben der Ratte (Sullivan et al. 1993) und kultivierten Krebszellen (Fortunati und Catalano 2006) beschrieben.

Verschiedene posttranskriptionale Glykolisierungsweisen von SHBG (Hardy et al. 1995), haben u.a. einen Einfluss auf die Interaktion mit dem SHBG Rezeptor (Gershagen et al. 1987).

2.1.1 Struktur

Das native SHBG ist ein heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90 bis 100 kDa (Suzuki und Sinohara 1987). Unter Denaturierung zerfällt das Protein im Blut in zwei Untereinheiten von 52 und 48 kDa, deren Polypeptidketten, nicht jedoch ihr Kohlenhydratanteil identisch sind (Hildebrand et al. 1995).

Das SHBG der Ratte ist ein Homodimer von 48 kDa, welches organspezifisch nicht variiert (Hammond und Bocchinfuso 1996). Evolutionell zeigt sich das Protein konservativ, weshalb sich zwischen dem Menschen und verschiedenen Tierarten nur wenig strukturelle Unterschiede zeigen (Joseph et al. 1987, Krupenko et al. 1994).

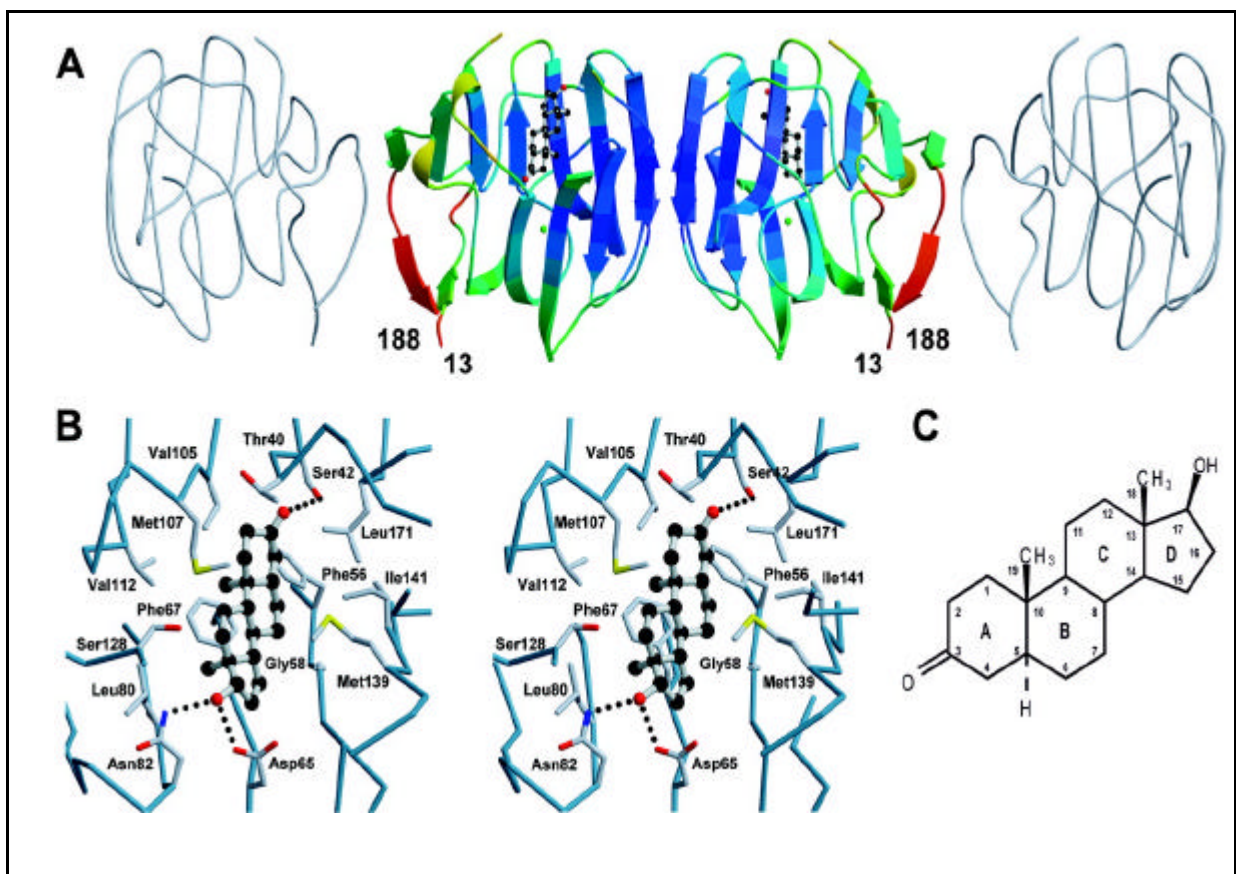


Abbildung 1A: Darstellung der dreidimensionalen Protein-SHBG-Struktur mit gebundenem Steroid. Glykoprotein (rot), Steroidbindungsdomäne (blau), Rezeptorbindungsdomäne (grün); 1B: detaillierte Herausarbeitung der DHT-Bindung, da SHBG zu DHT die höchste Bindungsaffinität besitzt; 1C: DHT-Struktur. (aus PubMed Datenbank der Proteinstruktur)

Die Proteinkette enthält 373 Gruppen, zwei Disulfidbrücken (zwischen Cys164-188 und 333-361), einen potenziellen O-Glykolysierungsort an Gruppe 7 und zwei N-Glykolysierungsorte an den Gruppen 351 und 367.

Die SHBG-Polypeptidkette beinhaltet mindestens drei funktionelle Domänen: die Steroid-bindende Region, die in den ersten 177 Aminosäuregruppen lokalisiert ist (vgl. Abb.1A blau), eine Region, die als Dekapeptid der Aminosäuren 48 und 57 an der N-terminalen Region mit einem Plasmamembran-Rezeptor in Wechselwirkung tritt (vgl. Abb.1A grün), und eine Region am C-terminalen Ende, die bei Untergruppen-Wechselwirkung beteiligt ist (vgl. Abb.1A blau) (Bocchinfuso und Hammond 1994, Khan et al. 1990, Hildebrand et al. 1995).

Bei Steroidbindung erfolgt eine Dimerisierung des Proteins, wobei die dimere Struktur auch nach Wiederablösung des Steroids erhalten bleibt (Bocchinfuso und Hammond 1994). Bis heute zwar nicht absolut bewiesen, aber allgemein anerkannt, ist, dass ein Mol SHBG-Dimer ein Mol Steroide bindet, indem das SHBG das Steroid zwischen seinen zwei Untereinheiten einkeilt (Hammond und Bocchinfuso 1996).

Die Integrität der Steroid-bindenden Region erfordert die Anwesenheit eines divalenten Kations wie z.B. Calcium (Ca^{2+}) oder Zink (Zn^{2+}) (Hammond 1990).

2.1.2 Funktion und Regulierung

Die bis dato bekannte Hauptfunktion von SHBG ist die spezifische Bindung und der Transport von Steroidhormonen im Plasma (Hammond 1990, Rosner 1990). Da nach gängiger Lehrmeinung nur ungebundene Steroide ihre Rezeptoren in den Zielzellen erreichen können, besteht die Hypothese, dass SHBG durch Bindung von Steroiden die Bioverfügbarkeit dieser Hormone reguliert (Petrusz 2002).

Eine andere Hypothese besagt, dass SHBG die metabolische Clearance der biologisch wichtigen Sexhormone, durch Bindung dieser, im Blut reduziert (Rosner 1990, Joseph und Baker 1992).

Eine weitere mögliche Funktion von SHBG ist, dass es durch seine unterschiedliche Bindungsaffinität zu Androgenen und Östrogenen das Verhältnis der relativen Verfügbarkeit von beiden Gruppen sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Situationen im Blut reguliert (Petrusz 2002).

In den letzten Jahren sind an vielen Zielzellen Hinweise für die Existenz von Sexhormon-Plasmamembran-Bindungsstellen bzw. Rezeptoren für SHBG gefunden worden (Rosner 1990, Khan et al. 1990). Dies unterstützt die These, dass SHBG den Eintritt von Steroiden in die Zelle oder/und die Zellreaktion auf diese reguliert. Durch Aktivierung des hypothetischen SHBG-Rezeptors wird eine intrazelluläre Kaskade ausgelöst, die mittels eines G-Proteins zu

einer Erhöhung der Konzentration des zyklischen Adenosin-Monophosphates/Cyclo-Adenosin-Mononukleotid (cAMP) in der Zelle führt (Nakhla et al. 1999). Ungeklärt ist bis jetzt, ob der Rezeptor durch einen bereits geformten SHBG-Steroid-Komplex (Strel'chyonok et al. 1984), durch Bindung von freiem SHBG mit darauffolgender Bindung des Steroids (Rosner 1990) (siehe Abb. 2) oder durch beide Varianten (Krupenko et al. 1994) aktiviert werden kann.

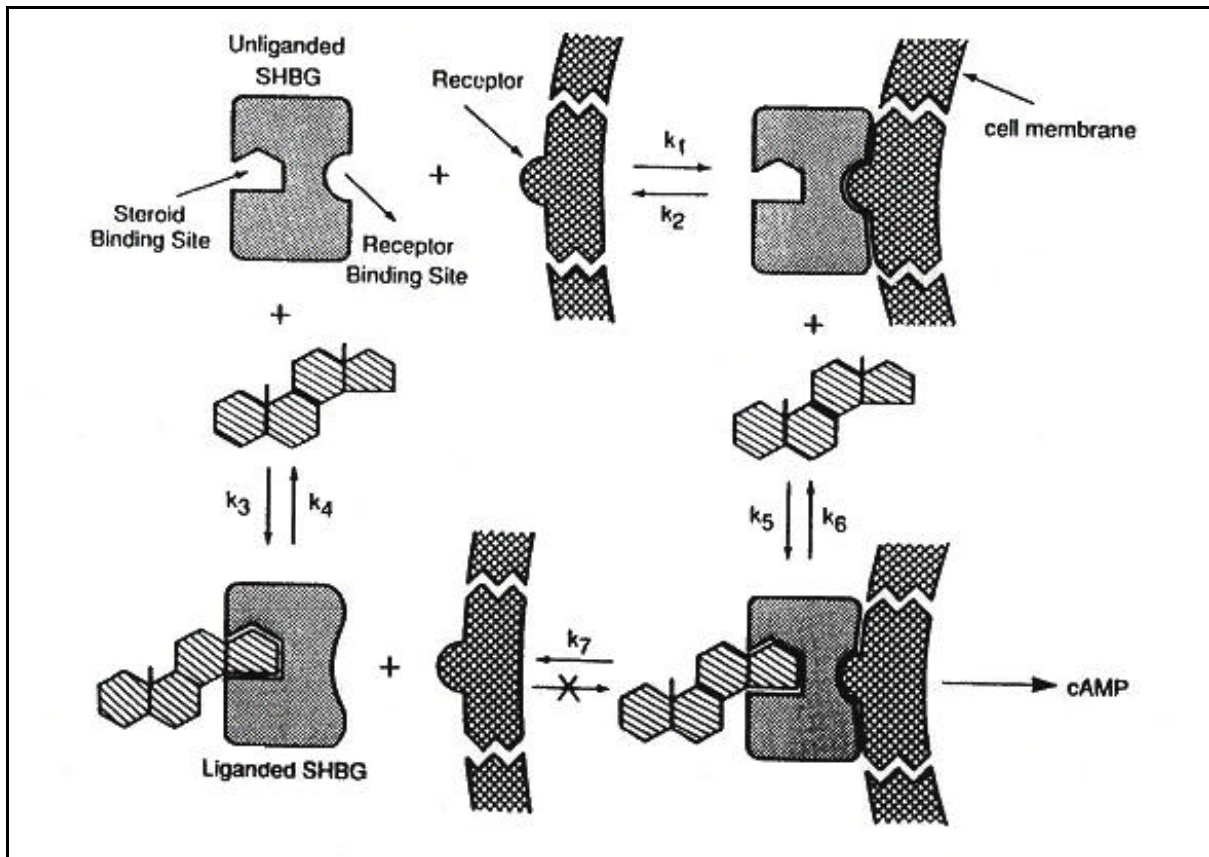


Abbildung 2: Schematische Darstellung vom Steroid-SHBG-RSHBG Signalsystem (angelehnt an Hyrb et al. 1990) aus Rosner et al. 1999.

Die biologische Halbwertszeit von SHBG liegt bei ca. 7 Tagen (Anderson et al. 1976). Während nur ein kleiner Teil (1-2%) der biologisch aktiven Steroide in freier Form im Blut zirkulieren, liegen beim Mann ca. 60% und bei der Frau ca. 20% des SHBGs ungebunden im Plasma vor (Petrusz 2002).

Die SHBG-Plasma Konzentration von Männern beträgt ungefähr die Hälfte von der der Frauen, wobei bei beiden Geschlechtern die Konzentration mit dem Alter langsam ansteigt (Vermeulen et al. 1996).

Bei Schwangeren wurde die höchste SHBG-Konzentration gemessen, die bis zu zehnmal höher liegt als bei Nicht-Schwangeren (Anderson et al. 1976, Ekelund und Laurell 1994).

Der Plasmaspiegel von SHBG wird durch verschiedene hormonelle und metabolische Faktoren beeinflusst und reguliert. Die wichtigsten sind hierbei Steroide wie Androgen und Estrogen, Thyroidhormone, Insulin, Blutfette und Körpergewicht. Androgene sowie Medikamente mit androgener oder progesteroner Wirkung (unabhängig ob natürlich oder synthetisch) reduzieren die SHBG-Konzentration im Blut (Selby 1990).

Auch bei Insulin ist eine SHBG-reduzierende Wirkung beobachtet worden. Die SHBG-Synthese und somit auch der SHBG-Plasmaspiegel werden unter dem Einfluss von Estrogenen (natürlichen oder synthetischen), Thyroidhormonen und verschiedenen Medikamenten (z.B. Antikonvulsiva und Rifampicin) erhöht (Selby 1990, Petrusz 2002).

2.1.3 Klinische Relevanz

Es sind keine natürlichen oder experimentellen Mutationen von SHBG bekannt, die seine Funktion beeinflussen. Dies und die Tatsache, dass die SHBG-Aminosäuren-Sequenz während der Evolution nahezu unverändert blieb (Joseph et al. 1987, Hammond 1990), unterstützt die Vermutung, dass SHBG essentiell für die Entwicklung ist, und zwar in dem Sinne, dass jegliche Mutation letal verläuft.

Allerdings sind bei verschiedenen Krankheiten charakteristische Veränderungen in der SHBG-Konzentration zu beobachten. Ein erhöhter SHBG-Spiegel liegt bei Hyperthyreodismus, Hypogonadismus, Androgen-Hyposensibilität, alkoholtoxischem Leberschaden bei Männern und Anorexia nervosa bei Frauen vor (Selby 1990). Auch bei an Morbus Alzheimer erkrankten älteren Frauen ist eine erhöhte SHBG-Konzentration nachgewiesen (Hoskin et al. 2004).

Auf der anderen Seite findet man einen erniedrigten SHBG-Spiegel bei Hyperandrogenismus (Pugeat et al. 2000), Hyperprolaktinämie, Akromegalie, unter Wachstumshormonbehandlung und bei stark adipösen Menschen (Glass 1989, Selby 1990, Petrusz 2002).

Bei hyperinsulinämischer Insulin-Resistenz im Menschen kann eine reduzierte SHBG-Konzentration als biologischer Marker dienen (Pugeat et al. 2000, Lewis et al. 2004).

Dementsprechend ist anzunehmen, dass SHBG auch die Kontrollwirkung von Androgenen und Estrogenen auf die Proliferierung von Prostata- und Brustkrebszellen beeinflusst (Petrusz 2002).

Der bei für das Ratten-SHBG-Gen transgenen Mäusen veränderte Phänotyp lässt darauf schließen, dass SHBG Einfluss auf die „steroidspezifischen“ Bereiche wie das Sexual- und Brutpflegeverhalten besitzt, aber auch für die Halte- und Gangmotorik eine Rolle spielt (Reventos et al. 1993, Larriba et al. 1995).

2.1.4 SHBG im Gehirn: Lokalisation und funktionelle Bedeutung

Die Gruppe um Wang berichtete 1990 von SHBG-Expression im Gehirn der Ratte (Wang et al. 1990). Hiernach wird SHBG in verschiedenen Regionen des Gehirns u.a. in den Magnozellulären Hypothalamuskernen synthetisiert. Außerdem beschreiben die Autoren SHBG-Immunoreaktivität in Perikarien und Prozessen in den Paraventrikulären und Supraoptischen Kerngebieten sowie in der externalen Zone der Median Eminence.

Weitere SHBG-Immunoreaktivität wurde in Neuronen des lateralen Hypothalamus, der internalen Zone der Median Eminence, der Periventrikulären Nuclei, der Lateralen und Medialen Präoptischen Region, der Perifornicalen Region und in den Herringkörpern der posterioren lobe Pituitary beschrieben (Herbert et al. 2003).

Bis heute ist wenig über die funktionelle Bedeutung von SHBG im Gehirn bekannt. Es ist beschrieben, dass die Infusion von SHBG in das Mediale Präoptische Gebiet und in den Medial Basalen Hypothalamus das Lordoseverhalten bei weiblichen Ratten induziert (Caldwell et al. 2000). In den genannten Regionen wurden Bindungsstellen für SHBG nachgewiesen (Caldwell 2001).

Es besteht eine partielle Koloalisation von SHBG und Oxytocin in Kerngebieten des Hypothalamus (Herbert et al. 2003). Daher wird vermutet, dass SHBG die Oxytocinsekretion in den magnozellulären Neuronen beeinflusst und darüber hinaus weitere Funktionen als neuroendokriner Faktor im Gehirn ausübt (Caldwell et al. 2003).

Die Gruppe um Gao (2003) zeigte, dass die SHBG-Konzentration im Gehirn durch Estrogene gesteuert werden kann. Die Autoren beschrieben eine reduzierte SHBG-Expression und einen reduzierten SHBG-Spiegel im Hypothalamus, in der Neurohypophyse und Hypophyse. Dies legt auch die Vermutung nahe, dass Estrogene als eine Art Releasing-Faktoren für das SHBG dienen könnten (Gao et al. 2003).

2.2 Estrogene

Estrogene zählen zu den Sexualhormonen. Dies sind Steroide, die in spezifischen Zelltypen in den Gonaden und dem Adrenalen Cortex produziert werden und von dort im Blut oder in anderen extrazellulären Flüssigkeiten in die Peripherie transportiert werden. Dort regulieren sie an verschiedenen Wirkungsorten u.a. Entwicklung, Fruchtbarkeit und Sexualverhalten (Petrusz 2002). Sie sind Steuerungsmediatoren, die auf Grund ihrer lipophilen Struktur auch in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit einen wichtigen Bestandteil in der Kommunikation zwischen Peripherie und Gehirn darstellen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Aufrechterhaltung und Physiologie des männlichen und weiblichen Reproduktionssystems sowie verschiedener Nicht-Reproduktionssysteme, wie

z.B. des kardiovaskulären, Skelett- und Zentralnervensystems (Gruber et al. 2002). So sind Estrogene u.a. während der Ontogenese entscheidend an der neuronalen Differenzierung des Gehirns beteiligt (Moore und Evans 1999).

2.2.1 Wirkungsweise von Estrogenen

Nach dem sogenannten „klassischen“ oder genomischen Mechanismus wirken Estrogene, gebunden an intrazelluläre Estrogenrezeptoren (ER), als Transkriptionsfaktoren, in dem sie die Genexpression bestimmter Proteine auf nukleärer Ebene kontrollieren (Beato et al. 1996). Diese Prozedur dauert mindestens 30-60 min.

Seit über 60 Jahren ist bekannt, dass Estrogene auch schneller - in Sekunden bis Minuten - auf die Zelle wirken können (Selye 1942, Sutter-Dub 2002, Cato et al. 2002).

Über den nicht-genomischen oder „schnellen“ Wirkungsmechanismus der Estrogene gibt es verschiedene Hypothesen, die zur Zeit nebeneinander bestehen.

So wurden Effekte von Estrogen an der Plasmamembran ohne die Mitwirkung von Rezeptoren beschrieben. Diese sind vermutlich durch Veränderungen innerhalb der Zellmembran erklärbar, erfordern allerdings unphysiologisch hohe Hormonkonzentrationen (Whiting et al. 2000)

Im Allgemeinen scheint die nicht-genomische Estrogen-Wirkung bei physiologischer Hormonkonzentration über transmembranständige Rezeptoren vermittelt zu werden (Heinlein und Chang 2002) (vgl. Abbildung 3).

So sind die „klassischen“ ER in der Lage, unabhängig von ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor, Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) zu aktivieren (Pappas et al. 1994, Kousteni et al. 2001).

Neben den „klassischen“ ER gibt es noch mindestens einen membranständigen Rezeptor, über den die Estrogene Second-Messenger-Kaskaden auslösen können. Dies resultiert im Allgemeinen in einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-, Inositoltriphosphat- und Diacylglycerol-Konzentration und lässt sich durch „klassische“ Steroidhormonantagonisten nicht blockieren (Lieberherr und Grosse 1994).

Einer dieser Rezeptoren könnte der SHBG-Rezeptor sein, der, an ein G-Protein gekoppelt, nach seiner Aktivierung ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Nakhla et al. 1999).

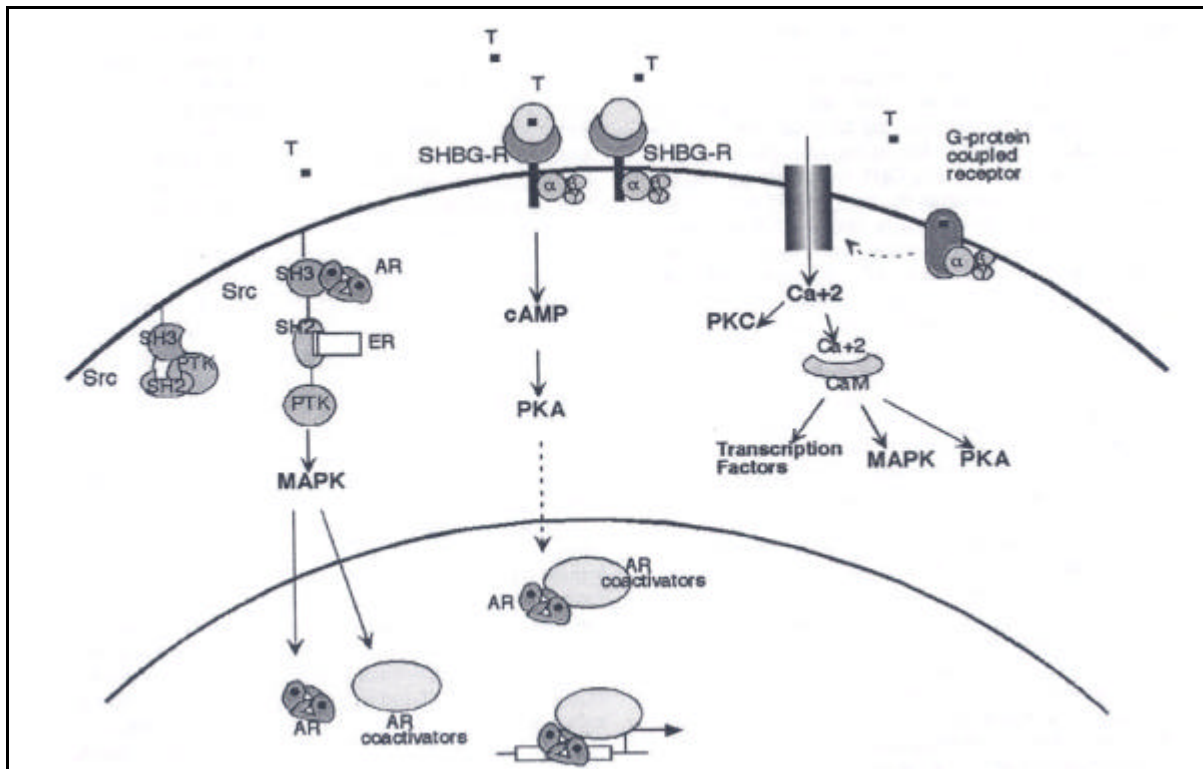


Abbildung 3: Nicht-genomische Wirkung von Androgenen kann über multiple Rezeptoren vermittelt werden. Androgene (T) können Second-Messenger-Kaskaden auf nicht-genomische Weise durch mehr als einen Mechanismus stimulieren. Androgene können die MAPK über die Stimulierung des Nicht-Rezeptors Tyrosin-Kinase c-Src (Src) aktivieren. Die Bindung von Androgen an SHBG kann cAMP und PKA aktivieren. Diese beiden Mechanismen beeinflussen die Transkriptionsaktivität von den nukleären Estrogenrezeptoren (AR). Der SHBG-Rezeptor (SHBG-R) wird hier gekoppelt an einen G-Protein-Komplex dargestellt. Zusätzlich zu diesen Rezeptoren kann ein GProtein-gekoppelter Plasmamembran-Rezeptor direkt Androgen binden oder indirekt die Aktivität von einem Androgen-Binding Protein in der Membran beeinflussen. Dieser Rezeptor ist noch nicht eindeutig identifiziert. Einer der Effekte dieses Rezeptors ist die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Dies führt zu einer Aktivierung von Signal-Transduktions-Kaskaden wie PKA, PKC und MAPK und kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. (Heinlein und Chang 2002)

2.2.2 Estrogenrezeptoren

Bis heute sind zwei verschiedene ER, α und β , identifiziert worden (Koike et al. 1987, Kuiper et al. 1996). Beide Rezeptoren haben eine spezifische Bindungsaffinität zu Estradiol und aktivieren die Transkription von einem Estrogen-Response-Element-Rezeptor-Gen-Konstrukt (Kuiper et al. 1996). Funktionell bestehen die ER aus drei Regionen: einer NH₂-terminalen Transaktivationsdomäne, einer zentral lokalisierten DNA-bindenden Domäne und einer COOH-terminalen Hormon-bindenden Domäne (Kumar und Thompson 1999). ER werden im Cytoplasma produziert, liegen jedoch in nicht aktivierter Form im Zellkern vor (Nilsson und Gustafsson 2000).

Ihr unaktivierter Zustand wird durch die Kopplung an Chaperone oder Cochaperones aufrechterhalten (Pratt und Toft 1997).

Die Aktivierung des ER erfolgt durch Estrogenbindung, der gebildete Komplex bindet als Dimer an regulierende DANN-Sequenzen von bestimmten Genen und aktiviert deren

Transkription. Für diesen Prozess wurden verschiedene coregulatorische Proteine nachgewiesen, die die Transkription sowohl fördern als auch verhindern können (Torchia et al. 1998).

Ein anderer Wirkeffekt der ER basiert auf einer Protein-Protein-Interaktion, die zwischen dem aktivierten ER und anderen Transkriptionsfaktoren stattfindet (Pike 2006).

2.2.3 Estrogene im Gehirn

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass Steroide einen Einfluss auf das Nervensystem ausüben, der weit über die Funktion der Regulierung von Gonadotropin-Sekretion und der Modulierung des Sexualverhaltens hinausgeht. So wurde berichtet, dass sowohl Androgene als auch Estrogene verbale Fähigkeiten, räumliches Vorstellungsvermögen, verbale Gedächtnistests und feinmotorische Fähigkeiten beeinflussen (Hampson 1990, Sherwin 1994, Kimura 1992 und 1996). Bei Tieren ist ein Zusammenhang zwischen Steroiden und Bewegungskoordination (Lacourse et al. 2007) und beim Menschen ein Einfluss auf die Parkinsonsche Krankheit und die Tardive Dyskinesie beobachtet worden (Kompoliti 2003, Lai et al. 2002).

Estrogene beeinflussen auch Symptome der Depression und die Behandlung dieser (Zhao et al. 2005).

In topographischen Studien sind die Steroidbindungsorte im Gehirn mit unterschiedlichen Methoden an verschiedenen Spezies untersucht worden. Dabei stehen autoradiographische Studien mit radioaktiv markiertem Estradiol (Pfaff und Keiner 1973, Stumpf und Sar 1976) immunozytochemischen Studien mit spezifischen Antikörpern gegen nukleäre ER α bzw. β gegenüber (Koch und Ehret 1989, Perez et al. 2003). Die Ergebnisse beider Methoden überlappen zum Teil (Sar und Parikh 1986).

Stumpf und Jennes (1984) beschreiben nach radiographischen Untersuchungen die Estradiolbindungsstellen als in Form von „Schaltkreisen“ angeordnet, die sich vom Allocortex über den Hirnstamm bis in das Zwischenhirn ziehen. Ein Hauptvorkommen von Estradiol-Bindungsaktivität wird in von der Stria terminalis verbundenen Strukturen und assoziierten Fasern postuliert (Stumpf et al. 1975).

Darüber hinaus wurden autoradiographisch bestimmte Estradiolbindungsstellen für die präoptische, hypothalamische, limbische sowie hippocampale Region und im Hypophysenvorderlappen beschrieben (Pfaff et al. 1976).

Immunocytochemische Untersuchungen bestätigen das Vorkommen von ER α und/oder β in diesen Regionen und lassen darüber hinaus ein breiteres Vorkommen der nukleären ER in Regionen wie z.B. im Cortex beobachten (Mitra et al. 2003, Perez et al. 2003).

Die bekannte Lokalisation von Estrogenbindungsstellen bzw. von klassischen nukleären ER kann die Vielfältigkeit der Estrogen-Effekte im Gehirn nur zum Teil erklären.

Die Stärke, die Geschwindigkeit sowie die funktionelle Lokalisation mancher Estrogen-Effekte deutet darauf hin, dass es auch im Gehirn noch weitere ungeklärte Wirkungsweisen von Estrogen gibt, die z.B. über membranständige Rezeptoren und/oder SHBG vermittelt werden könnten.

3 Ziele der Arbeit und Fragestellung

SHBG konnte in mehreren Regionen des Gehirns verschiedener Spezies nachgewiesen werden. Im Gehirn der Ratte ist die intrinsische Herkunft belegt (Wang et al. 1990). Seine Molekülgröße von 47kDa lässt vermuten, dass es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, und legt somit nahe, dass auch weitere Spezies, bei denen SHBG im Gehirn nachgewiesen werden konnte, dieses dort exprimieren.

Die Beschreibung der SHBG-Funktion als reines Bindungsglobulin im Blut hat sich bereits seit geraumer Zeit als unvollständig herausgestellt. Die Erkenntnis der Existenz eines intrinsischen cerebralen SHBG-Systems eröffnet neue Aspekte und Fragen über das Funktionsspektrum von SHBG.

Estrogene haben einen wichtigen Einfluss sowohl auf die Entwicklung als auch auf die Aufrechterhaltung der cerebralen Funktion.

Die klassischen Estrogenrezeptoren α und β und deren messenger Ribonukleinsäure (mRNA) sind im Gehirn nachgewiesen und ihre Lokalisation wurde sowohl immunozytochemisch als autoradiographisch in verschiedenen Spezies detailliert beschrieben (Stumpf et al. 1980, Gasc 1981, Mitra et al. 2003).

Die Vielfältigkeit der Steroidwirkung und funktionelle Studien geben Hinweise, dass die Estrogene auch über nicht-genomische schnelle Weise im Gehirn wirken (Chaban et al. 2004).

Die Interaktion von Estrogenen, Estrogenrezeptoren und SHBG in diesem Zusammenhang ist ungeklärt. Es stellt sich die Frage, ob SHBG bei der nicht-genomischen Vermittlung von Estrogenwirkung eine Rolle spielt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine topographische Beschreibung und Dokumentation der Verteilung von SHBG im gesamten Mausgehirn zu erstellen. Des Weiteren wird die Colokalisation von SHBG und ER α untersucht und beschrieben.

Hierzu werden immunozytochemische Verfahren verwandt. Zur Bestimmung der SHBG-Verteilung wird die mittels Diaminobenzidin (DAB) gekennzeichnete Immunoreaktivität lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Colokalisation von SHBG mit ER α wird mit Hilfe der Fluoreszenz-Doppelfärbung, die fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wird, bestimmt.

Auf der Grundlage der genauen Lokalisation von SHBG werden mögliche Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung des Proteins im Gehirn aufgezeigt.

Die Colokalisations-Studie zu SHBG und ER α gibt Hinweise auf mögliche Interaktion von Estrogenen, Estrogenrezeptoren und SHBG. Es werden Rückschlüsse auf eventuelle Zusammenhänge bzw. Eigenständigkeiten dieser Systeme aufgezeigt.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Zur Lokalisation von SHBG wurden C57BL/6J Mäuse (Männchen: 11, Weibchen: 2, homozygot für Ratten SHBG Männchen: 4, Weibchen: 2) im Alter von 90 Tagen verwendet.

Die Tiere stammten aus der Tierhaltung der University of North Carolina in Chapel Hill, wo sie unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter und künstlichem vierzehn zu zehnstündigem Tag-Nacht-Rhythmus untergebracht waren.

Das „Institution Animal Care and Use Committee“ der Universität von North Carolina genehmigte die Protokolle, die für diese Studie angewandt wurden.

Die Tötung der Mäuse erfolgte unter tiefer Äthernarkose durch kardiale Perfusion mit 0,01%iger Heparin-in-Phosphatpuffer-Lösung und 4%iger Formaldehydlösung in Phosphatpuffer (PBS) als Fixans.

Jedes Tier wurde mit 30ml Fixans durchspült und 30 min später dekapitiert. Die Gehirne wurden entfernt und über Nacht im selben Fixans nachbehandelt.

Am folgenden Tag wurde das fixierte Gewebe in PBS mit einem Vibratom (Lancer Vibratome Series 1000) in 75µm dicke Schnitte geschnitten, die in Serie bis zur Färbung in PBS aufbewahrt wurden.

Für die Doppelfärbung wurde das oben beschriebene Verfahren an 2 unbehandelten männlichen Mäusen (90 Tage) der Tierhaltung der Friedrich-Schiller-Universität Jena verwendet, wo sie unter den selben Standardbedingungen gehalten wurden.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren wurden folgende Basislösungen verwendet:

PBS 0,01M (pH7,5)		4% Formaldehydlösung in PBS	
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,4g	Na ₂ PO ₄ * H ₂ O	4,0g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	5,2g	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,5g
NaCl	17,6g		
Aqua dest.	2000ml	Aqua dest.	1000ml

4.2 Immunzytochemie

4.2.1 SHBG -Färbung

Nach Vorbehandlung mit Alkohol (50% Ethanol für 10 min, 70% Ethanol für 30 min, 50% Ethanol für 10 min) wurden die Schnitte für 10 min in 2% Ziegen-Normalserum in PBS

präinkubiert. Als primärer Antikörper diente ein polyklonaler Ratten-Anti-ABP (Nr. F244), der nach standardisiertem Protokoll durch intradermale Immunisierung von Kaninchen gegen relevante Peptidfragmente des ABP in Prof. Dr. Peter Petrusz' Labor hergestellt wurde. Die Inkubation erfolgte in einer 1:3000 Lösung in 1% Ziegen-Normalserum/0,1 NaN₃/PBS bei 4°C über Nacht.

Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen, für 10 min mit 2% Ziegen-Normalserum in PBS gebadet und erneut gewaschen.

Als nächstes wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper, einem Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Firma Vectastain) in einer Verdünnung von 1:100, bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

Nach einem erneuten Waschgang in PBS wurde ein Vectastain Standard ABC kit (Avidin-Biotin-Komplex *horse radish peroxidase*) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) verwendet, um immunreaktives ABP mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen dunkelbraun darzustellen.

Nach dem Färben wurden die Schnitte zunächst in TRIS-Puffer (2 x 10 min), dann in 1% Polyvinyl Alkohol (10 min) gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht luftgetrocknet. Am folgenden Tag wurden sie mit Permount eingedeckelt.

Für die immunzytochemische Kontrolle wurden zum einen bei einigen Präparaten der primäre Antikörper mit 0,5 bis 1,0 mg/ml Antigen Peptid vorinkubiert, zum anderen das Färbeverfahren ohne primären AK durchgeführt. Die verwandten Schnitte zeigten keine spezifische Immunoreaktivität.

4.2.2 Fluoreszenzdoppelfärbung für SHBG und ER α

Nach Vorbehandlung mit Alkohol (50% Ethanol für 10 min, 70% Ethanol für 30 min, 50% Ethanol für 10 min) wurden die Schnitte für 10 min in 2% Ziegen-Normalserum in PBS gebadet. Als primärer Antikörper diente wie im oben beschriebenen Verfahren der polyklonale Ratten-Anti-ABP (Nr. F244). Die Inkubation erfolgte in einer 1:3000 Lösung in 1% Ziegen-Normalserum/PBS bei 4°C über Nacht. Nach einem 30 min Waschgang in PBS wurden die Schnitte zur Darstellung des immunoreaktiven ABP mit Cy3 markierten Anti-Kaninchen IgG Fab Fragment (1:500 in PBS) für 4 h bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert.

Darauf folgte ein erneutes Waschen für 30 min in PBS, bevor die Schnitte mit dem zweiten primären Antikörper Anti-ER α (Santa Cruz MC20) in einer 1:2500 Lösung in 1% Ziegen-Normalserum/PBS bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Zur Markierung des

immunoreaktiven ER a wurde mit Cy2 markiertes Anti-Kaninchen IgG (1:100 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer) verwandt.

Nach 60 min Waschen in PBS wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit Veronal-Glycerol im Verhältnis 2:8 eingedeckelt.

Bei den oben beschriebenen Verfahren wurden folgende Basislösungen verwendet:

PBS 0,01M (pH7,5)		TRIS-Puffer 0,05M (ph7,6)	
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,4g	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	12,1g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	5,2g	HCl (1,0M)	76,8ml
NaCl	17,6g		
Aqua dest	2000ml	Aqua dest.	2000ml

4.3 Mikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung und Dokumentation der mit DAB visualisierten Präparate erfolgte mit einem Olympus BX 100 Lichtmikroskop und der Olympus DP 10 Kamera unter Zuhilfenahme der Software DP –Soft.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Doppelfärbung wurden die Schnitte mit einem Axioplan-Mikroskop von Zeiss ausgewertet.

Die Fotografien wurden mit einer Digital Kamera SPOT (Diagnostic Instruments) und der Software SPOT 32 Vs 2.2.1. (Diagnostic Instruments) angefertigt.

Zur Lokalisierung und Dokumentation diente die zweite Auflage des stereotaktischen Atlas ‘The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates’ von George Paxinos und Keith B.J.Franklin (2003) und das Programm Photo Draw.

5 Ergebnisse

5.1 Lokalisation von SHBG – Zelluläre Beschreibung

Die im Folgenden beschriebene Färbung ist zytoplasmatisch, Zellkerne bleiben ungefärbt. Sie ist auf keinen Neuronentyp beschränkt. Es zeigen sich heterogene Neuronenpopulationen, magno- und parvozellulär sowie multi- und bipolare Neurone, positiv für SHBG.

Die Lokalisation von SHBG deckt sich nicht mit bekannten anatomischen Strukturen, viel mehr zeigt sich meist nur eine Teilklasse bestimmter Kerngebiete immunoreaktiv für SHBG.

Durch die angewandte Schnittdicke von 75µm gelingt es, ganze Zellen sowie die Verzweigung ihrer Ausläufer darzustellen. Allerdings ist es nicht möglich, bei den angefärbten Zellfortsätzen Axone und Dendriten zu unterscheiden.

Es können unterschiedlich varikositätenreiche Gebiete beobachtet und daraus Schlüsse auf axonalen Transport von SHBG und die Projektionsrichtungen gezogen werden.

Im Rahmen der Projektvorbereitung wurden verschiedene Antikörper (AK) getestet, die alle ein identisches Verteilungsmuster für SHBG zeigten. Mit dem AK aSHBG F244 wurden die besten Färbeergebnisse erzielt, weshalb er für diese Studie verwandt wurde.

Der AK aSHBG F244 wurde nach standardisiertem Protokoll in Peter Petrusz' Labor an der University of North Carolina, USA hergestellt und seine Spezifität ist biochemisch bewiesen (Feldman et al. 1981).

Bei der Kontrollinkubation mit Normalserum sowie bei der Inkubation mit seinem Proteinpräinkubierten AK zeigte sich keine Immunoreaktivität.

Es wurde die im Folgenden beschriebene SHBG-Verteilung gefunden.

5.2 Lokalisation von SHBG-Morphologische Beschreibung

5.2.1 Bulbus olfactorius

Der akzessorische Bulbus olfactorius, die Mitralzellen und die internale plexiforme Schicht weisen intensiv gefärbte Zellkörper auf. Auch im anterioren Nucleus (Ncl.) olfactorius sind immunoreaktive Zellkörper - allerdings mit geringerer Dichte - zu beobachten.

Auffällig sind die stark immunoreaktiven Axone der Glomerularzellschicht (Abb. 4).

Im Tuberkel olfactorius (Abb. 5) zeigen sich große, stark immunoreaktive Zellen, Fasern erscheinen hingegen ungefärbt (vgl. Abb. 56 B und 56 C).

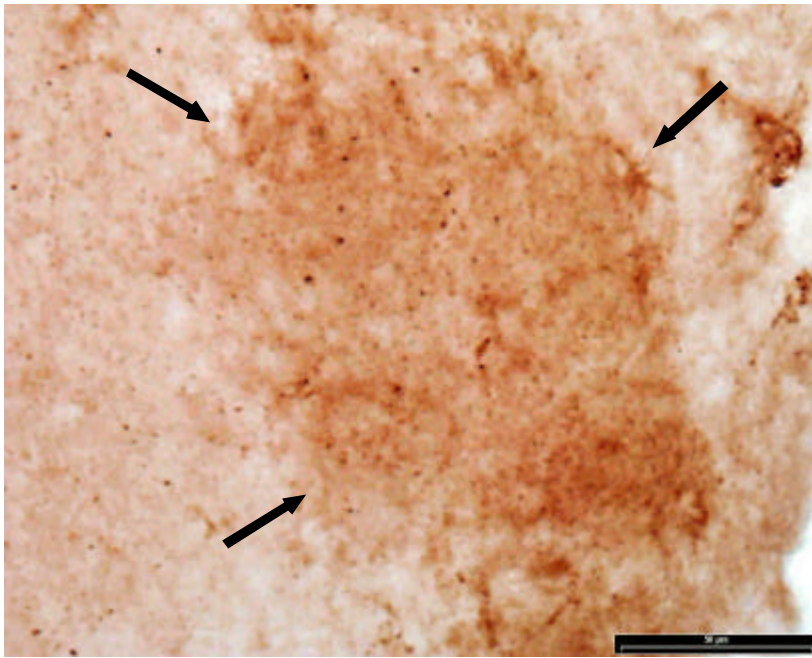


Abb. 4: SHBG-Färbung der Glomerularzellschicht
Immunoreaktiver Glomerulus olfactorius (Pfeile)

Messbalken = 50µm

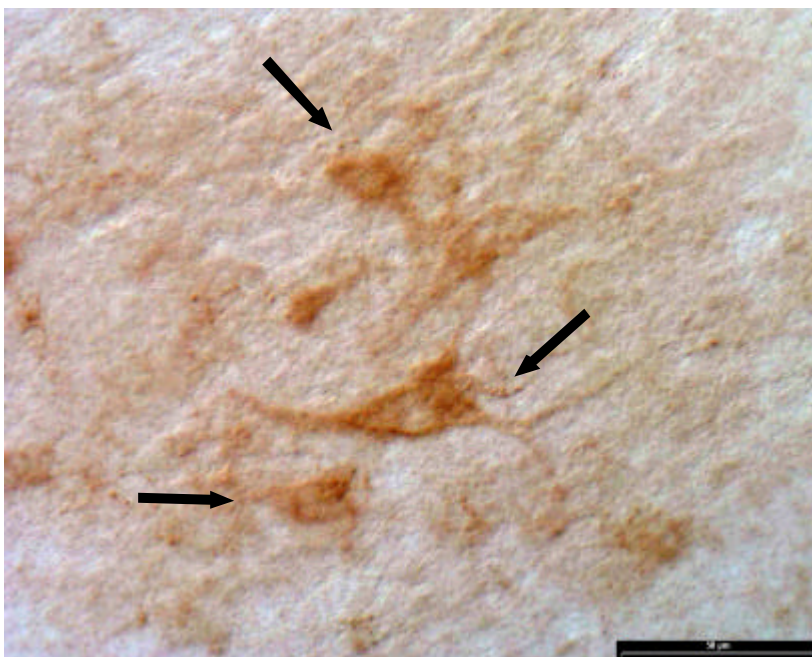


Abb. 5: SHBG-Färbung des Tubercel olfactorius
Immunoreaktive Zellkörper mit Ausläufern (Pfeile)

Messbalken = 50µm

5.2.2 Neocortex

Über den gesamten Neocortex des Vorderhirns erscheinen die Pyramidenzellen der äußeren und inneren Pyramidenschicht (Schicht III und V) in hoher Dichte angefärbt (Abb. 6).

Deutlich vergrößert sind diese angefärbten Schichten III und V im Bereich der zweiten somatosensorischen Rinde, des granulären, dysgranulären und hinteren agranulären Inselcortex (vgl. Abb. 57 B) sowie der ectorhinalen und perirhinalen Rinde (vgl. Abb. 57 C).

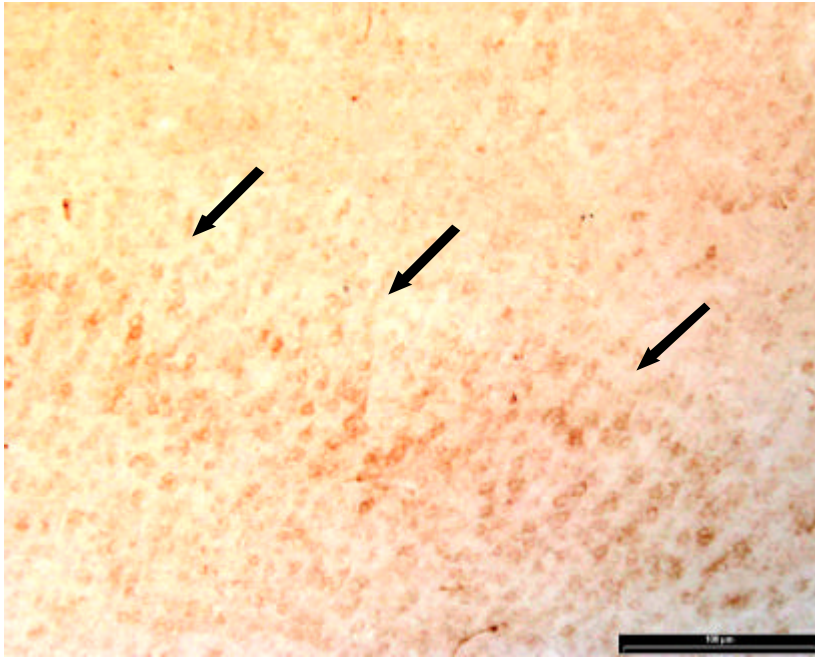


Abb. 6: SHBG-Färbung des motorischen Cortex
Immunoreaktive Pyramidenzellschicht (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Auch im Frontalcortex sind intensiv angefärbte Zellkörper (vgl. Abb. 56 A) zu beobachten (Abb. 7). Die Dichte dieser Neurone erscheint zentral höher als in der Nähe des Cortex.

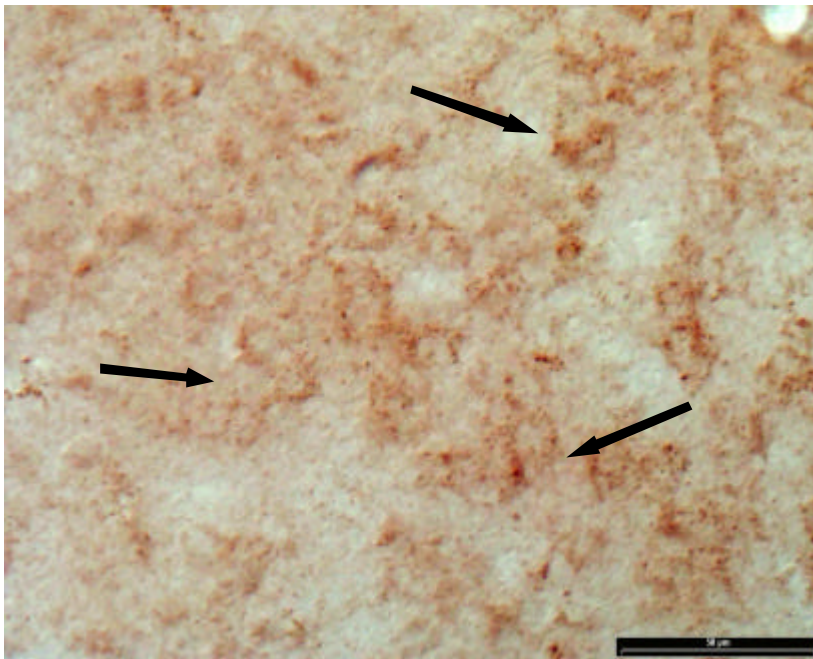


Abb. 7: SHBG-Färbung des Frontallappens
Anhäufung immunoreaktiver Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

5.2.3 Basalganglien

Während im Claustrum, Striatum und Pallidum keine Immunreaktivität zu beobachten ist, lassen andere Strukturen der Basalganglien ein spezifisches Verteilungsmuster für SHBG erkennen.

So weist das Corpus amygdaloideum speziell in seinem lateralen Anteil (lateralis Ncl. amygdalae, dorsaler und ventrolateraler Teil und basolateraler Ncl. amygdalae, anteriorer Teil) verstreute immunoreaktive Zellkörper auf (Abb. 8) (vgl. Abb. 57 B und C).

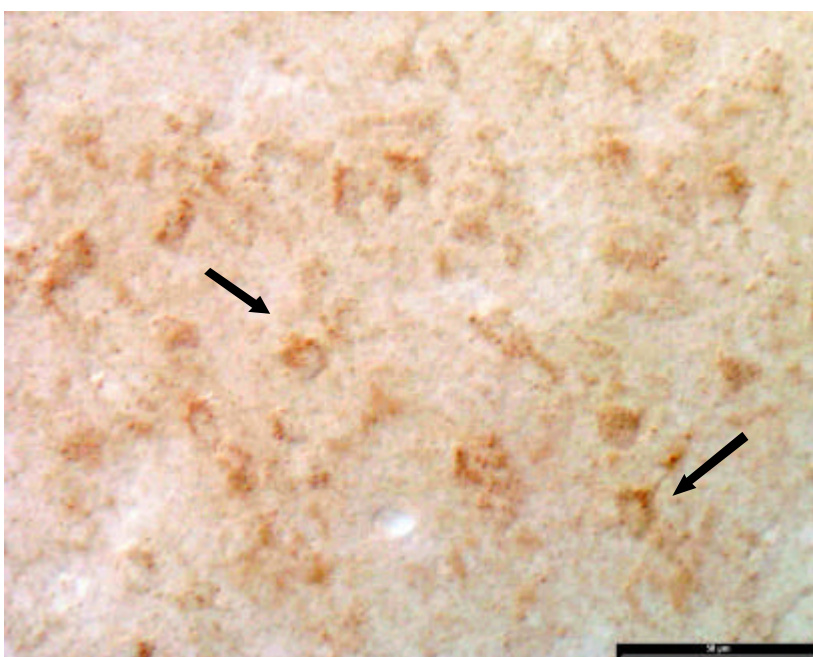


Abb. 8: SHBG-Färbung Corpus amygdaloideum, laterales Teilgebiet
Vereinzelte immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

Im frontalen Teil der Ansa lenticularis zeigen sich große Zellkörper (vgl. Abb. 56 B) mit Ausläufern immunoreaktiv (Abb. 9), weiter dorsal finden sich immunoreaktive Fasern (vgl. Abb. 57B).

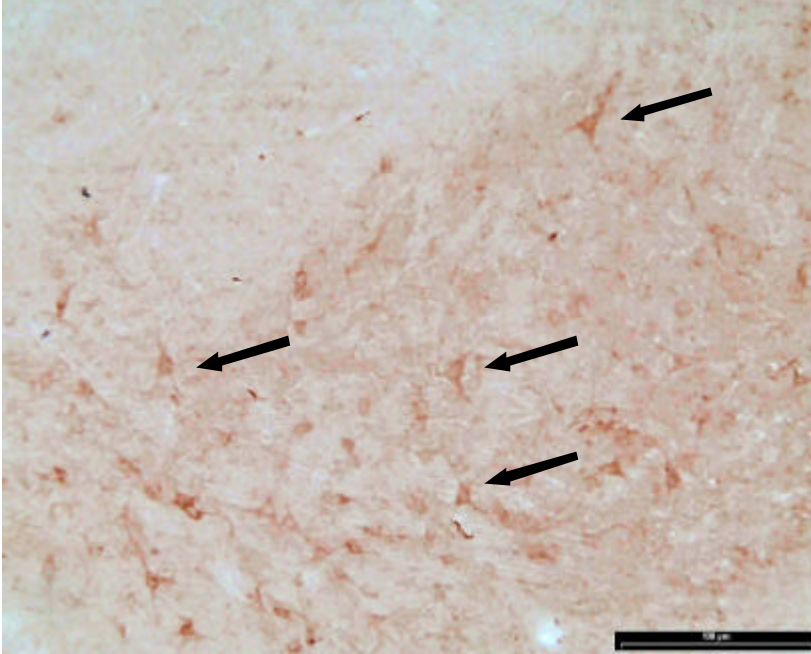


Abb. 9: SHBG-Färbung der Ansa lenticularis
Immunoreaktive Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

In der Substantia nigra findet sich eine hohe Dichte SHBG-positiver Zellen (vgl. Abb. 58 B), während Fasern nur vereinzelt angefärbt sind (Abb. 10). Die Verteilung erscheint im gesamten Kerngebiet der Substantia nigra homogen und differiert nicht zwischen den verschiedenen Teilgebieten.

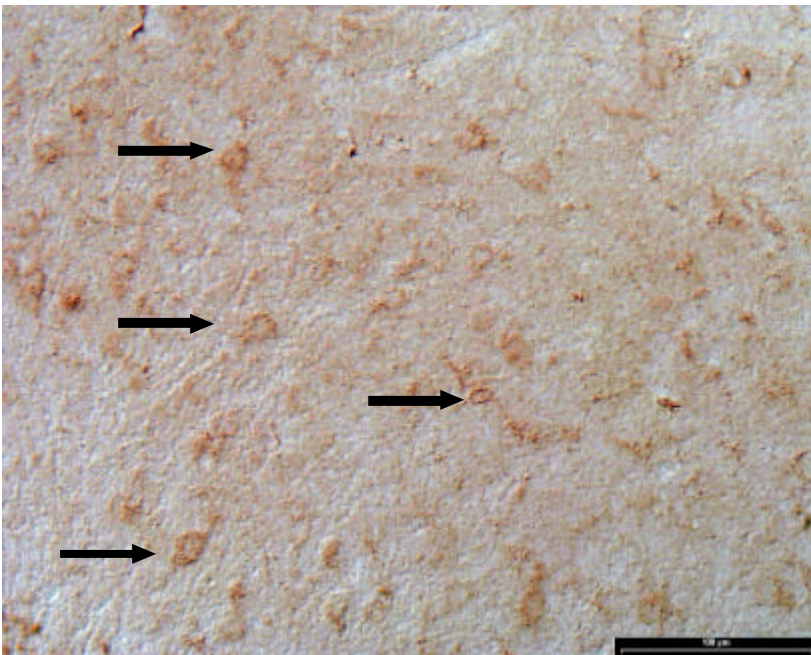


Abb. 10: SHBG-Färbung der Substantia nigra pars reticularis
Immunoreaktive Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Im Gegensatz hierzu unterscheidet sich die SHBG-Immunoreaktivität innerhalb des Ncl. accumbens. Während der mediale Anteil der Schale immunreaktive Fasern aufweist, sind im Kern vereinzelt gefärbte Zellen und keine Fasern zu beobachten (Abb. 11) (vgl. Abb. 56 B).

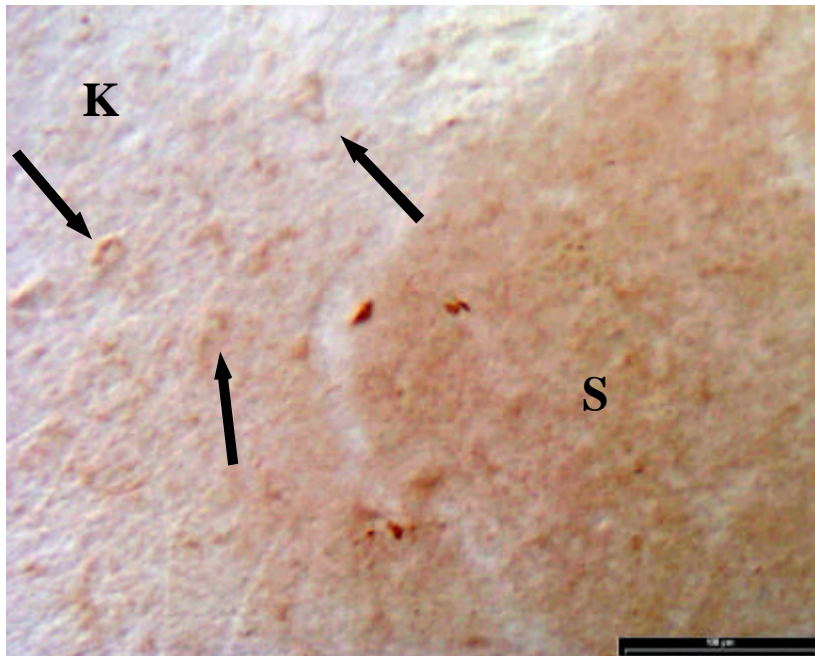


Abb. 11: SHBG-Färbung des Ncl. accumbens

Immunoreaktive Fasern im medialen Anteil der Schale (S), vereinzelt angefarbte Zellen (Pfeile) im Kern (K)

Messbalken = 100µm

5.2.4 Septum

Der mediale Anteil des praeoptischen Septums weist frontal stark angefärbte Fasern und nur vereinzelt immunoreaktive Zellkörper auf (Abb. 12). Distal hiervon erscheinen auch im lateralen Anteil des praeoptischen Septums angefärbte Fasern. Es scheint, dass SHBG-positive Fasern von medial nach lateral ziehen (vgl. Abb. 56 C und 57 A).

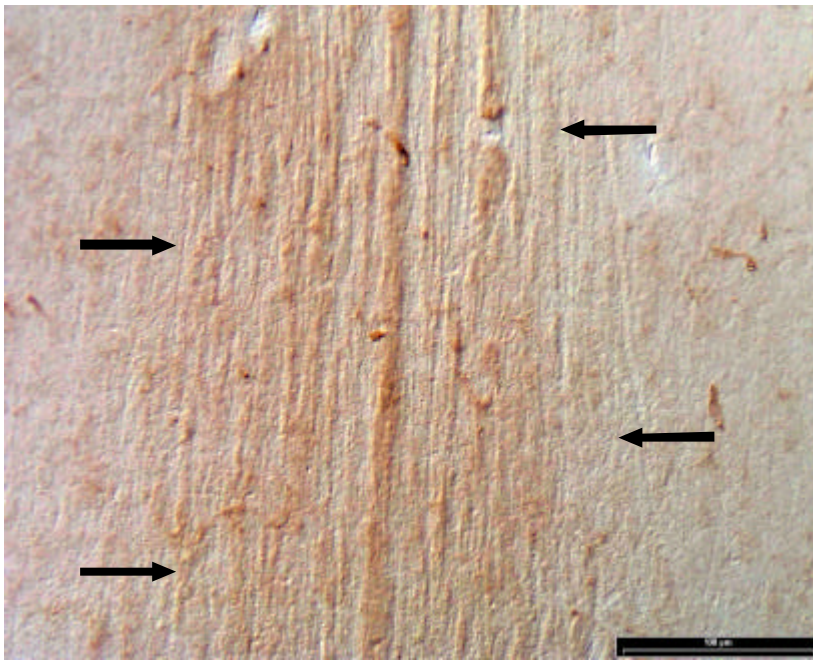


Abb. 12: SHBG-Färbung des medialen praeoptischen Septums
Immunoreaktive Faserzüge (Pfeile)

Messbalken = 100μm

Immunoreaktive Zellen sowie Fasern sind ebenfalls im Ncl. magnocellularis commissurae posterioris (Abb. 13) sowie im Ncl. des diagonalen Bandes nach Broca zu beobachten (vgl. Abb. 56 C und 57 A). Die Commissura anterior hingegen erweist sich als nicht immunoreaktiv.

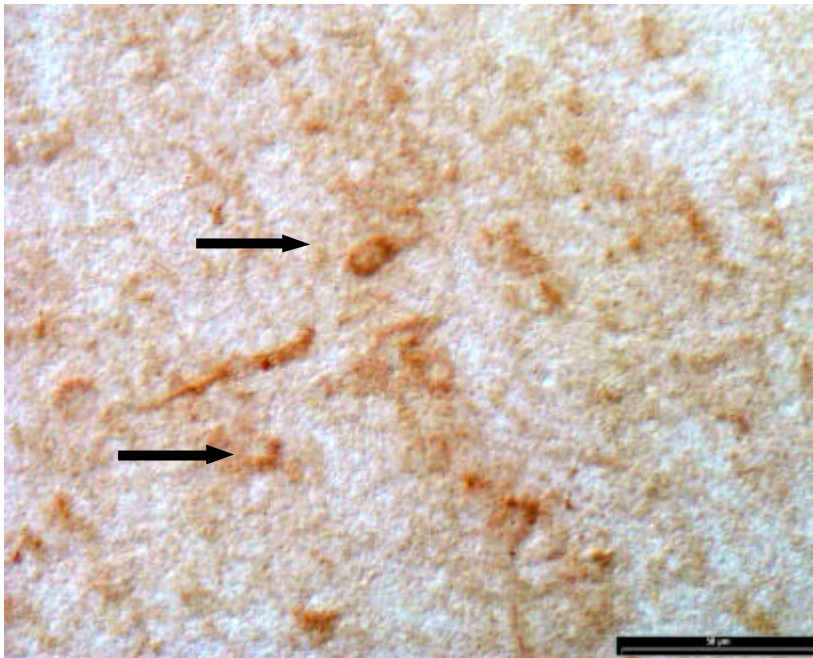


Abb. 13: SHBG-Färbung des Ncl. magnocellularis commissurae posterioris
Immunoreaktive Fasern mit eingestreuten Zellkörpern (Pfeile).

Messbalken = 50µm

5.2.5 Hippocampus und Allocortex

Der Hippocampus weist ein spezifisches Verteilungsmuster für SHBG auf (Abb.14).

So findet sich im Tractus pyramidalis in den Schichten 1 bis 3 des Cornus ammonis (CA 1-3) (vgl. Abb. 57 B und C) eine hohe Dichte stark angefärbter Axone, die sich weiter distal nur auf CA2 und CA3 beschränkt (vgl. Abb. 58 A).

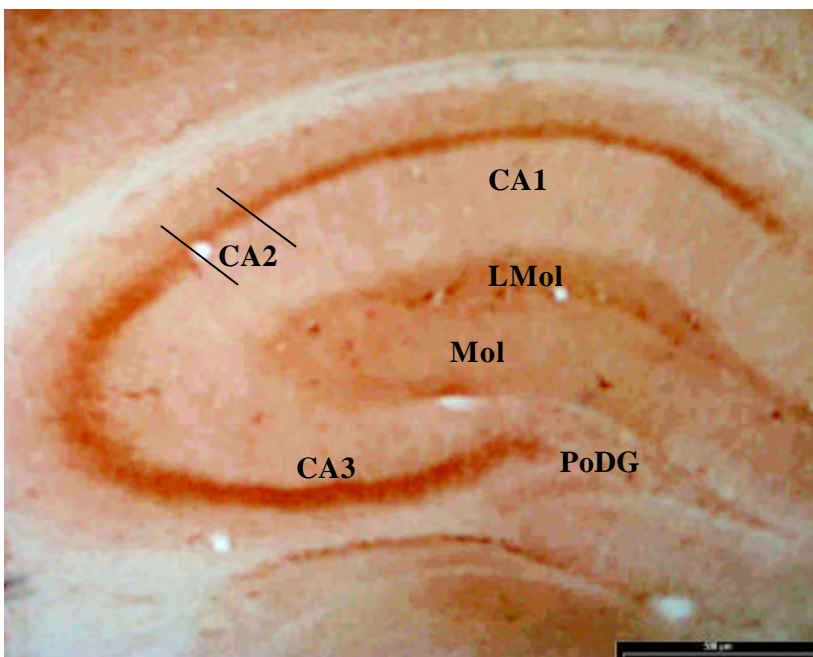


Abb. 14: SHBG-Färbung des Hippocampus

Übersichtsaufnahme:
immunoreaktive Fasern im
Cornus amonis (CA 1-3),
Lakunare Molekularschicht
des Hippocampus (LMol),
Molekularschicht des Gyrus
dentatus (Mol),
polymorphe Schicht des
Gyrus dentatus (PoDG)

Messbalken = 500µm

In der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus erscheinen nicht-pyramidale Zellkörper für SHBG positiv (Abb. 15) (vgl. Abb. 57 C und 58 A), während sich im piriformen Cortex

deutlich die Pyramidenzellen immunoreaktiv für SHBG zeigen (Abb. 16). Lateral zu dieser Zellschicht schließt sich eine immunoreaktive Faserschicht an (vgl. Abb. 56 B und C).

Im Subiculum fallen besonders intensiv angefärbte große Zellkörper auf (Abb. 17) (vgl. Abb. 58 A).

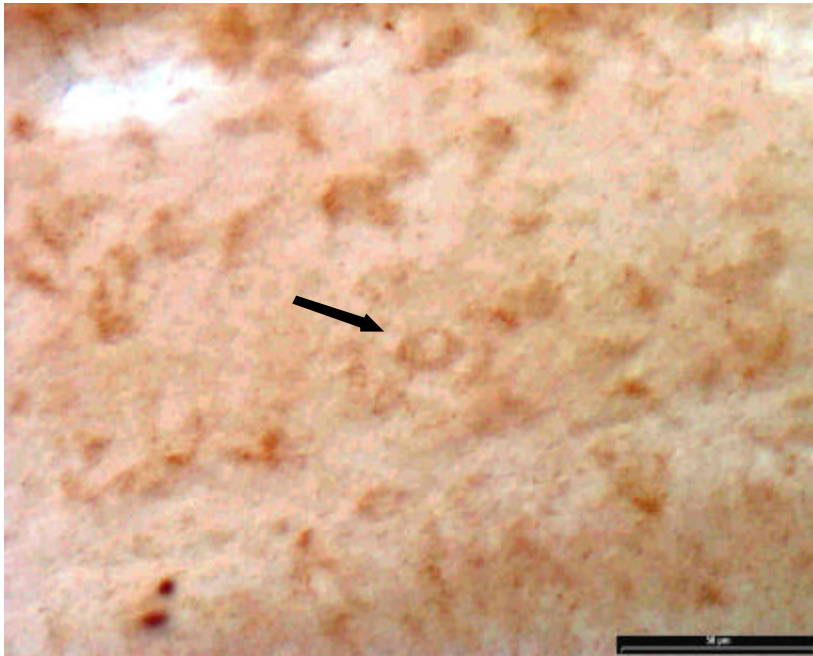


Abb. 15: SHBG-Färbung des Gyrus dentatus

Immunoreaktive nicht-pyramidale Zellen in der polymorphen Schicht (Pfeil exemplarisch)

Messbalken = 50µm

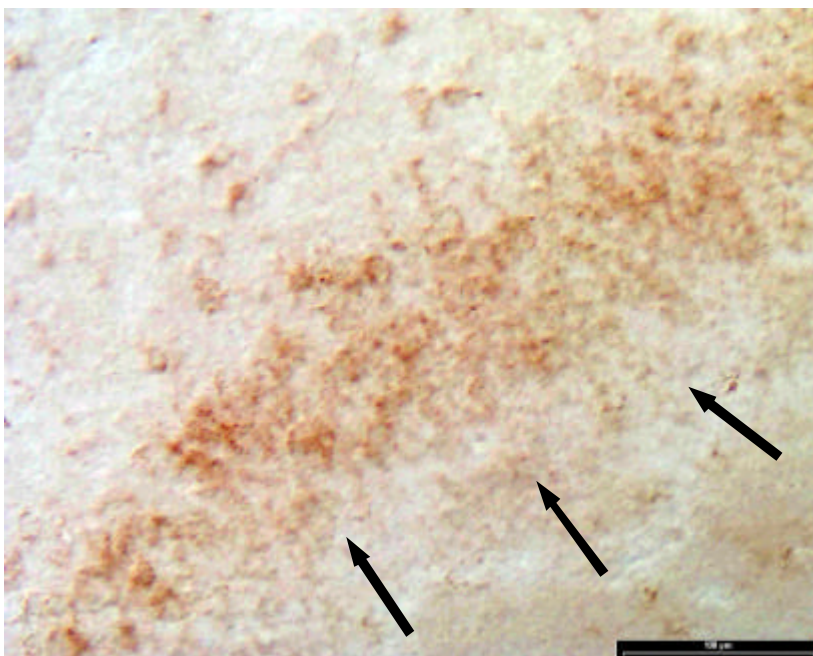


Abb. 16: SHBG-Färbung des Cortex piriformis

Angefärbte Pyramidalzellschicht (Pfeile)

Messbalken = 100µm

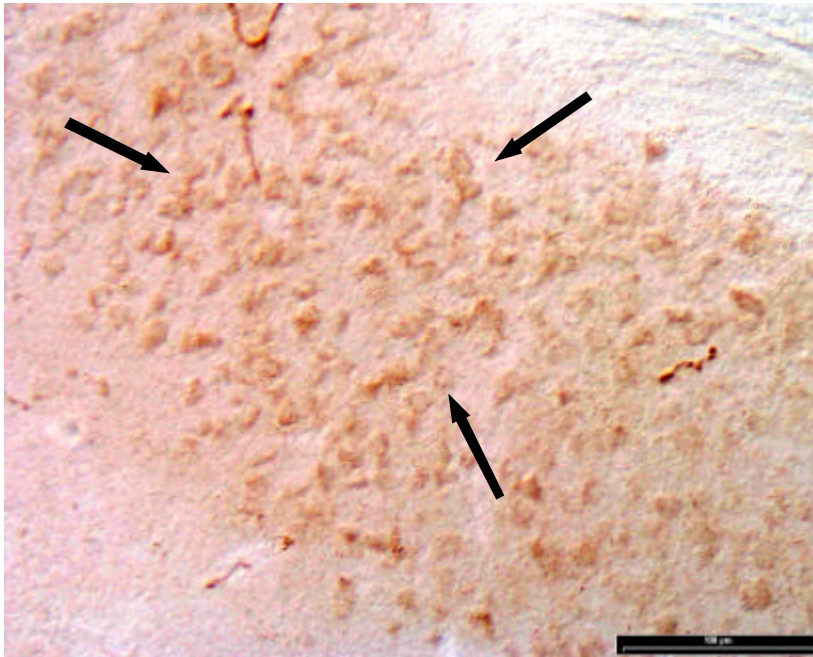


Abb. 17: SHBG-Färbung des Subiculums

Immunoreaktive Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100 μm

5.2.6 Thalamus

Während der ventrale und der ventrolaterale Anteil des Thalamus keine spezifische Färbung aufweist, findet sich im lateralen Anteil spezifische Immunoreaktivität.

So sind in den am Hippocampus gelegenen Teilgebiete des Ncl. laterodorsalis thalami und Ncl. lateroposterior thalami gefärbte Fasern und sehr vereinzelt eingestreute gefärbte Zellen zu beobachten (Abb. 18) (vgl. Abb. 57 B und C).

Im Corpus geniculatum laterale zeigen sich sowohl Zellkörper als auch Fasern immunoreaktiv. Auch das Corpus geniculatum mediale weist vereinzelt immunoreaktive Zellen auf (Abb. 19) (vgl. Abb. 58 B).

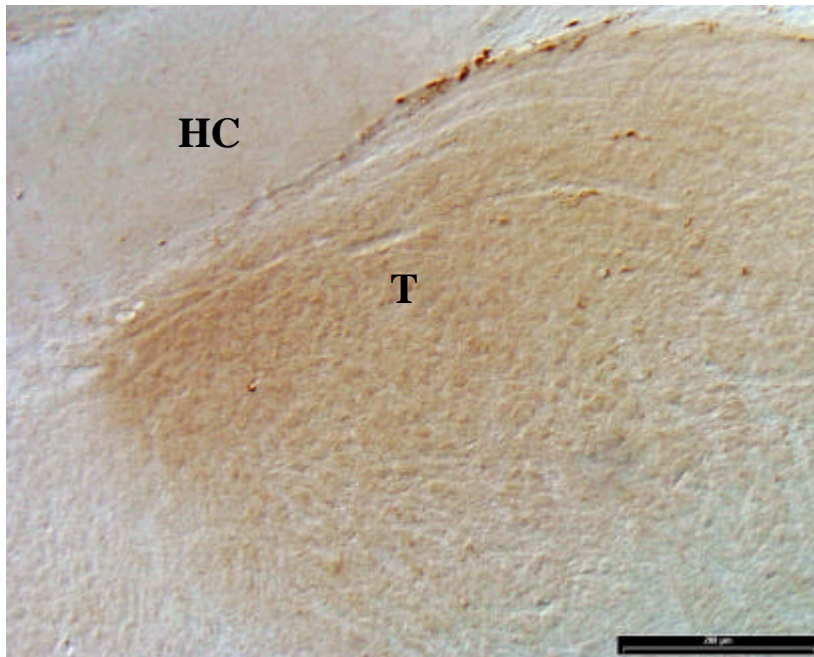


Abb. 18: SHBG-Färbung des lateralen Thalamus

Immunoreaktive Fasern und vereinzelt Zellen in Teilgebieten des Ncl. lateroposterior und Ncl. laterodorsalis (T) neben dem Hippocampus (HC)

Messbalken = 200µm

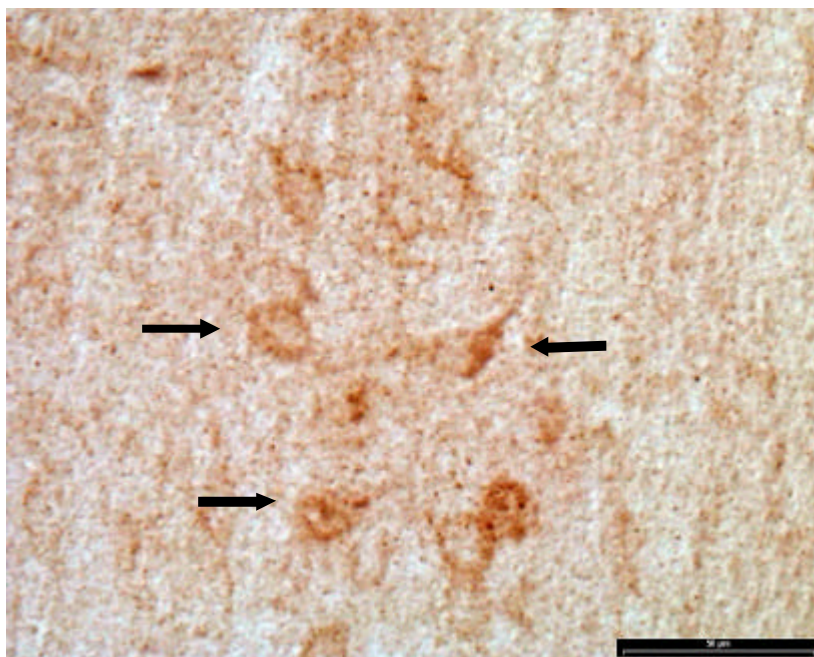


Abb. 19: SHBG-Färbung des Corpus geniculatum mediale

Vereinzelt immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50µm

5.2.7 Hypothalamus

Im Vergleich mit anderen Gehirnregionen erscheint der Hypothalamus der Maus eine geringere Dichte an SHBG aufzuweisen. Allerdings sind Anfärbungen spezifischer Teilgebiete deutlich auszumachen, wobei meist magnozelluläre Neurone gefärbt erscheinen.

Im vorderen Anteil des Hypothalamus zeigen sich im Ncl. suprachiasmaticus (Abb. 20) parvozelluläre und im Ncl. paraventricularis (Abb. 21) (vgl. Abb. 57 B) sowie in der praeoptischen Region (Abb. 22) (vgl. Abb. 57 A) magnozelluläre Neurone vereinzelt positiv für SHBG. Während die ersten beiden Kerngebiete auch immunoreaktive Fasern aufweisen,

ist in der praeoptischen Region keine Färbung von Fasern zu beobachten. Der Ncl. supraopticus hingegen weist keine Immunoreaktivität auf.

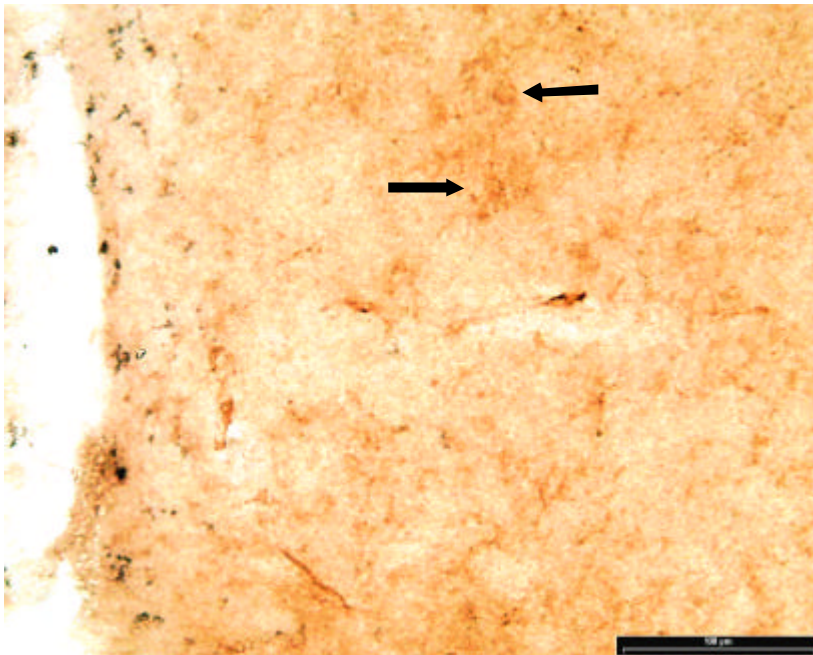


Abb. 20: SHBG-Färbung des Ncl. suprachiasmaticus
Vereinzelt immunoreaktive parvocelluläre Neurone exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

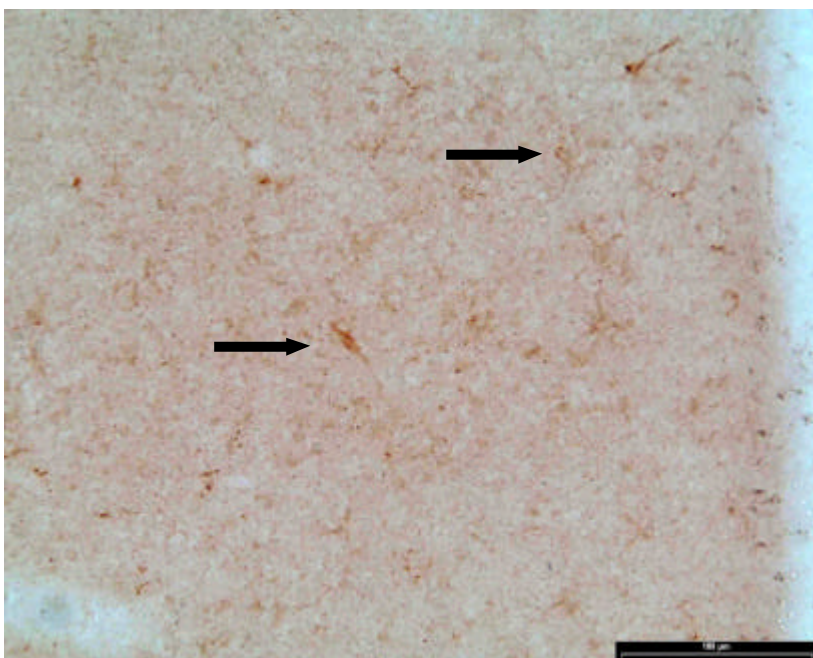
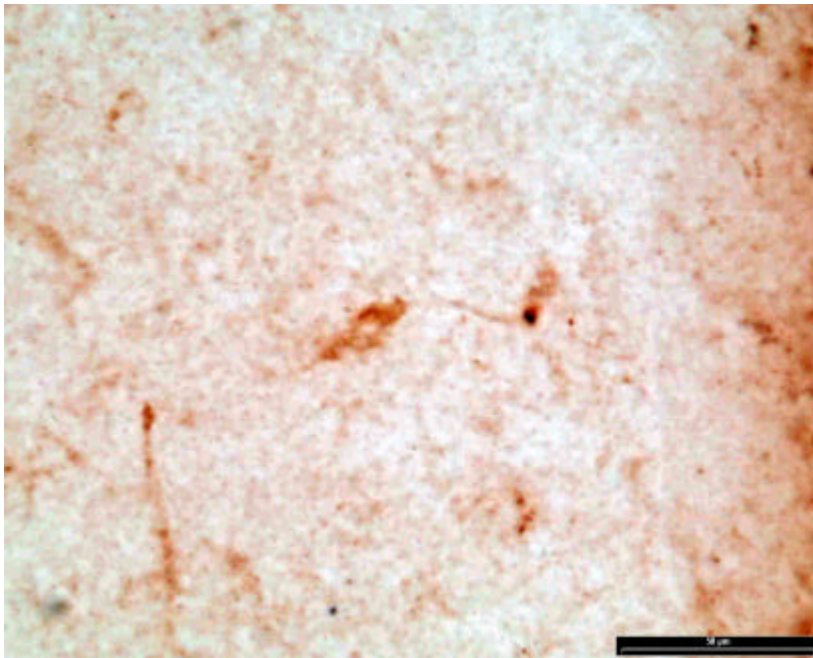


Abb. 21: SHBG-Färbung des Ncl. paraventricularis
Vereinzelte immunoreaktive magnozcelluläre Neurone exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

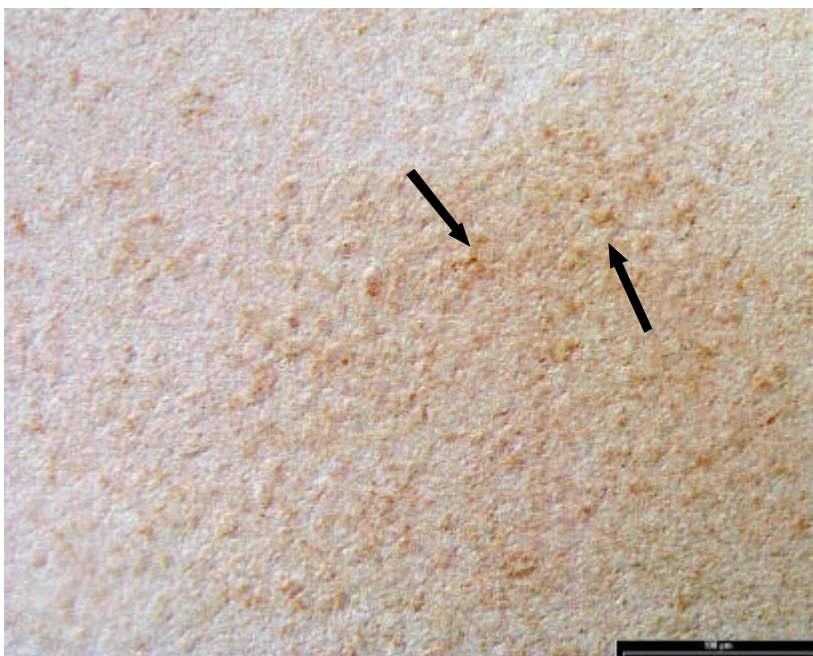


**Abb. 22: SHBG-Färbung
der Area praeoptica**
Immunoreaktive Neuroen
(Pfeil)

Messbalken = 50µm

Die mediale Kerngruppe des Hypothalamus weist im ventromedialen Anteil gefärbte Zellkörper sowie Fasern auf (Abb. 23).

Auch im Ncl. arcuatus sind immunreaktive parvozelluläre Zellkörper zu beobachten (Abb. 24) (vgl. Abb. 57 B und C).



**Abb. 23: SHBG-Färbung
der Ncl. ventromedialis**
Immunreaktive Fasern und
Zellen, exemplarisch markiert
(Pfeile)

Messbalken = 100µm

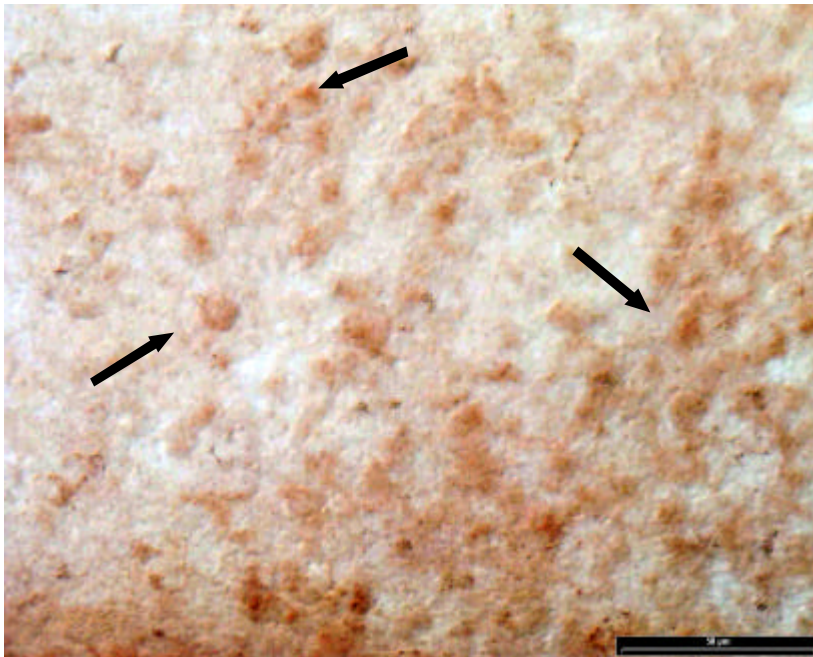


Abb. 24: SHBG-Färbung des Ncl. arcuatus

Immunoreaktive parvocelluläre Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50µm

Im caudal-lateralen Anteil des Hypothalamus finden sich im Tuber cinereum und im Ncl. periventricularis für SHBG positive Fasern (vgl. Abb. 57 B).

Die Nucleuli (Ncll.) praemamillariae weisen immunoreaktive Zellen auf (Abb. 25).

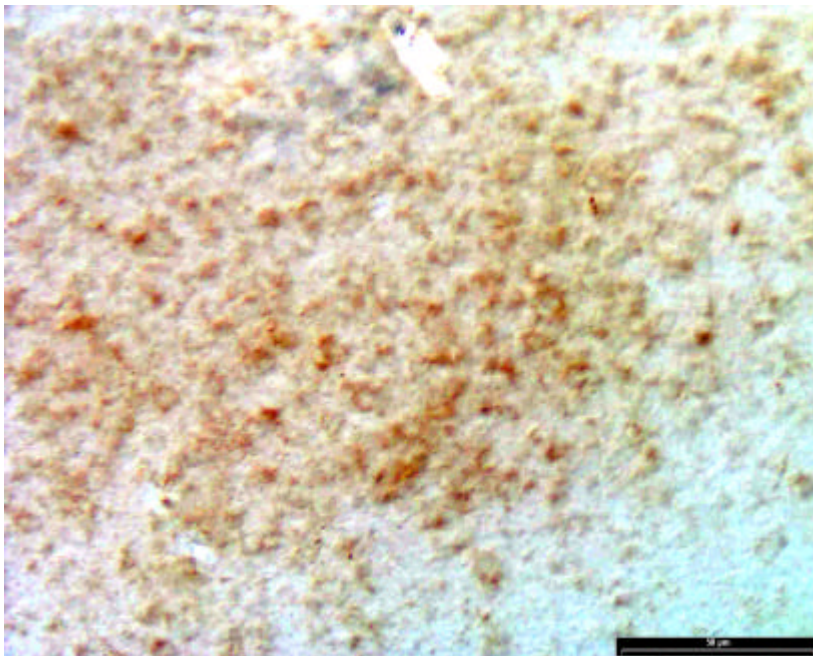


Abb. 25: SHBG-Färbung der Ncl. praemamillariae

Anhäufung immunoreaktiver Zellen (Pfeile)

Messbalken = 50µm

Verschieden afferente sowie efferente Faserverbindungen des Hypothalamus zeigen ebenfalls spezifische Immunoreaktivität für SHBG.

So weisen die Eminentia mediana (Abb. 26) sowie das Subformicale Organ (Abb. 27) eine hohe Dichte stark immunoreaktiver Fortsätze auf.

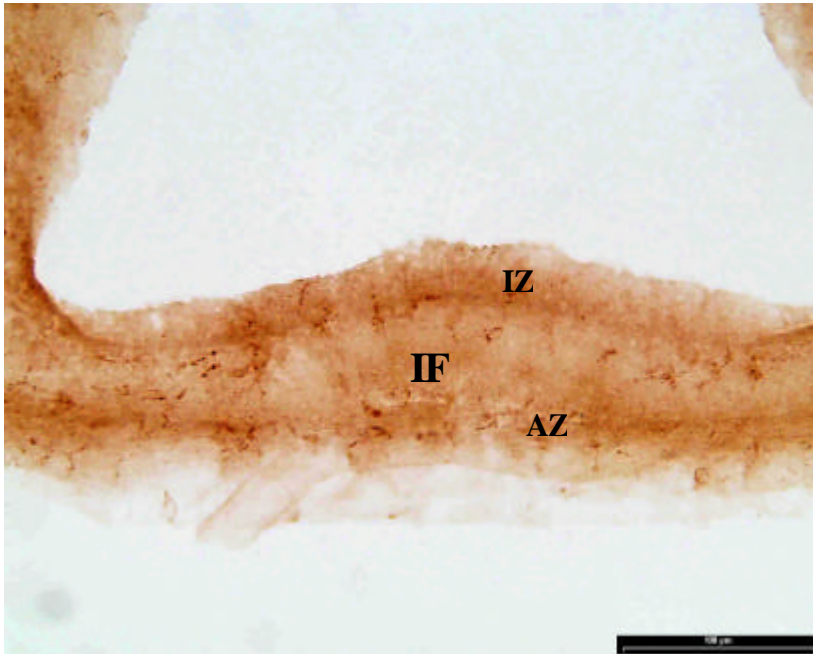


Abb. 26: SHBG-Färbung der Eminentia mediana
Innenzone (IZ), Außenzone (AZ), Immunoreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 100µm

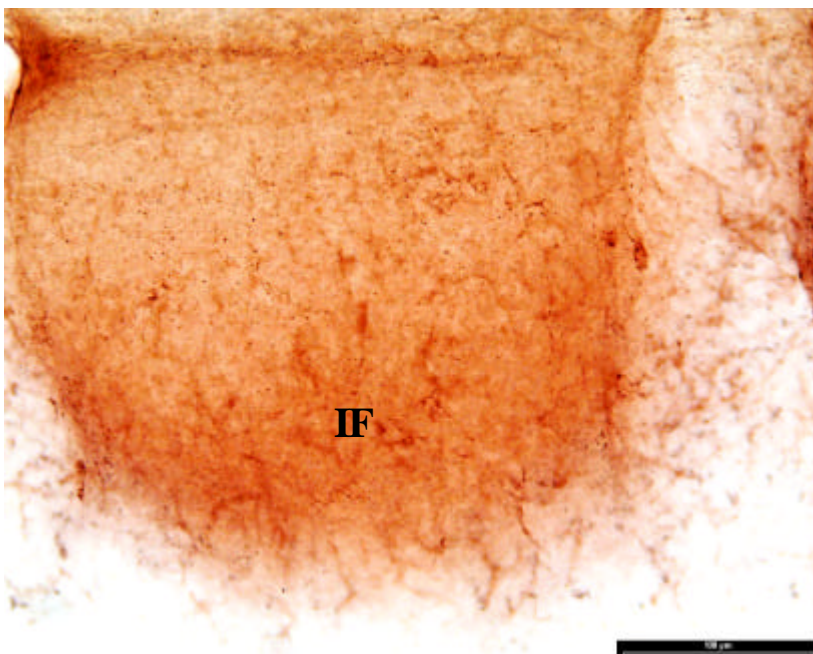


Abb. 27: SHBG-Färbung des Organum subformicale
Immunoreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 100µm

Im Bed nuclei (ncl.) der Stria terminalis sind sehr vereinzelt magnocelluläre Perikarien stark immunoreaktiv (Abb. 28). Die Zona incerta zeigt wenige SHBG-positive Zellkörper sowie Fasern.

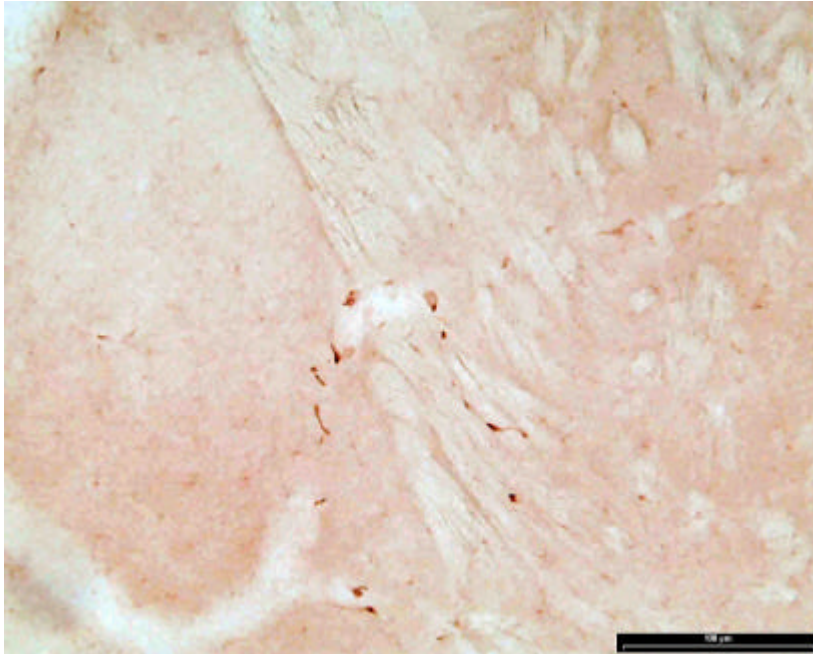


Abb.28: SHBG-Färbung des Bed ncl. striae terminalis
Vereinzelt immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

5.2.8 Tectum

Im Tectum besteht eine mittlere Dichte immunreaktiver Zellen in allen Schichten des Colliculus superior (Abb. 29) (vgl. Abb. 58 B) sowie im zentralen Kerngebiet des Colliculus inferior (Abb. 30) (vgl. Abb.58 C). Zelluläre Fortsätze zeigen sich in beiden Gebieten hingegen nur mäßig angefärbt.

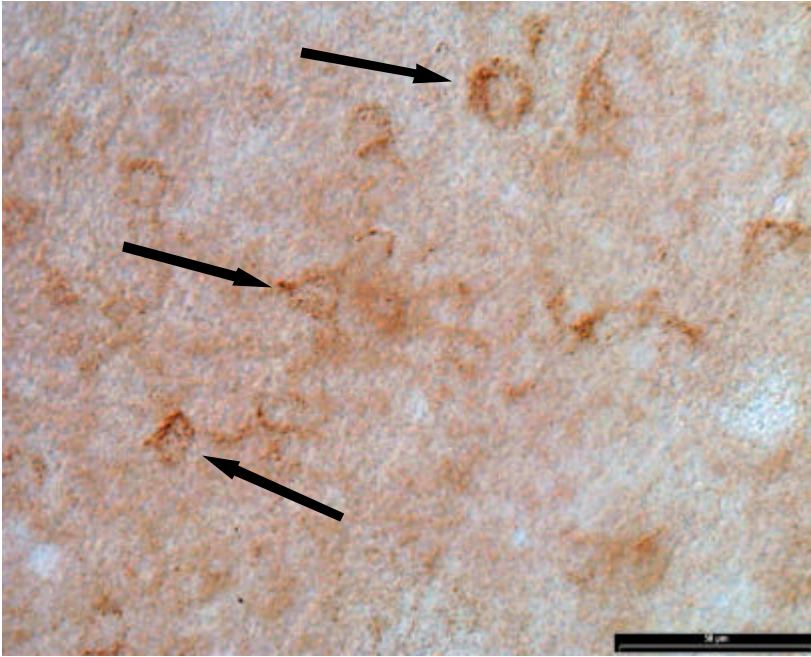


Abb. 29: SHBG-Färbung des Colliculus superior
Immunoreaktive Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50µm

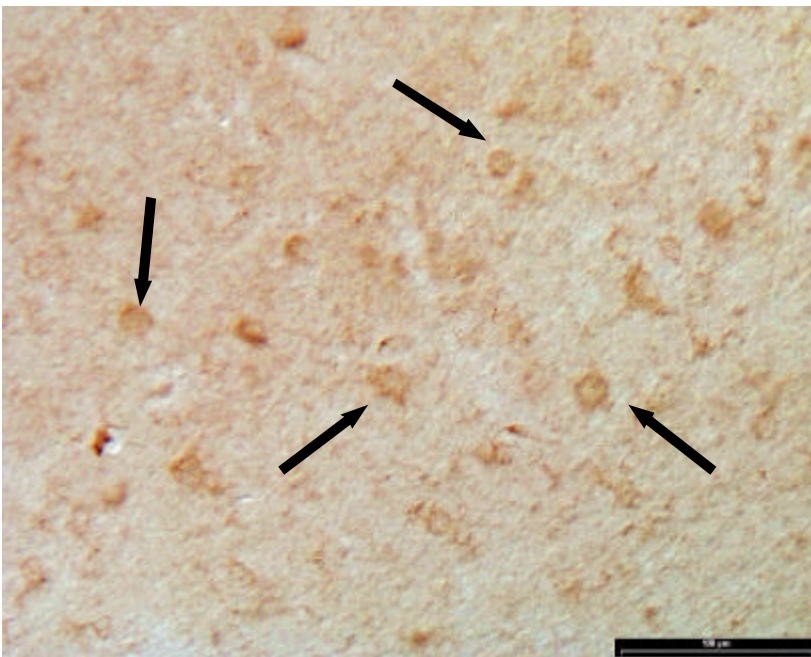


Abb. 30: SHBG-Färbung des Colliculus inferior
Immunoreaktive Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Im Ncl. brachii colliculi inferioris und im Kerngebiet der Habenulae (Abb.31) sind stark SHBG positive Fasern zu beobachten.

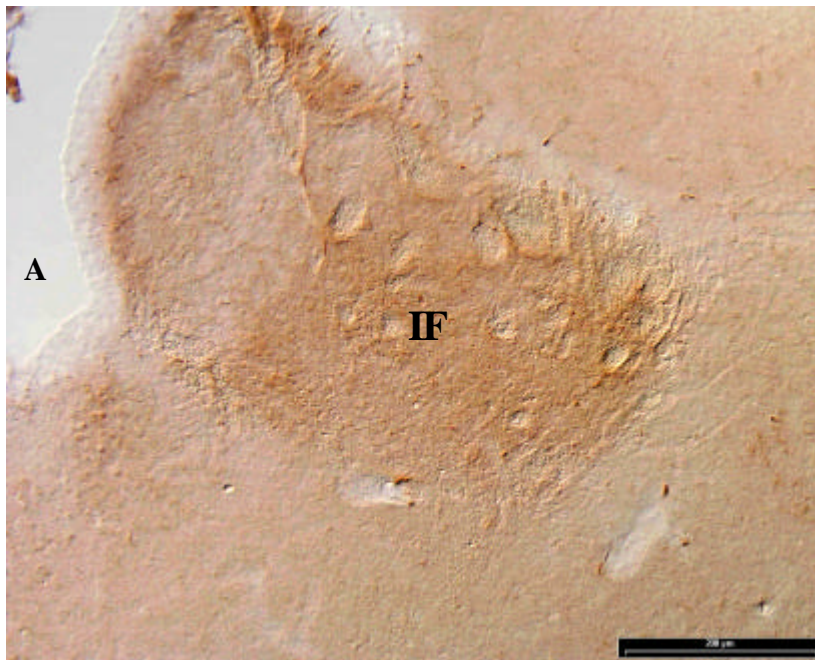


Abb. 31: SHBG-Färbung der Ncl. habenulae
Aqueduct (A),
Immunoreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 200µm

5.2.9 Tegmentum

Verschiedene im Tegmentum lokalisierte Strukturen weisen spezifische Verteilungsmuster für SHBG auf.

Das Periaqueductale Grau ist von immunreaktiven Fasern durchzogen, zwischen denen immunreaktive Zellen eingelagert sind (Abb .32) (vgl. Abb. 58 B).

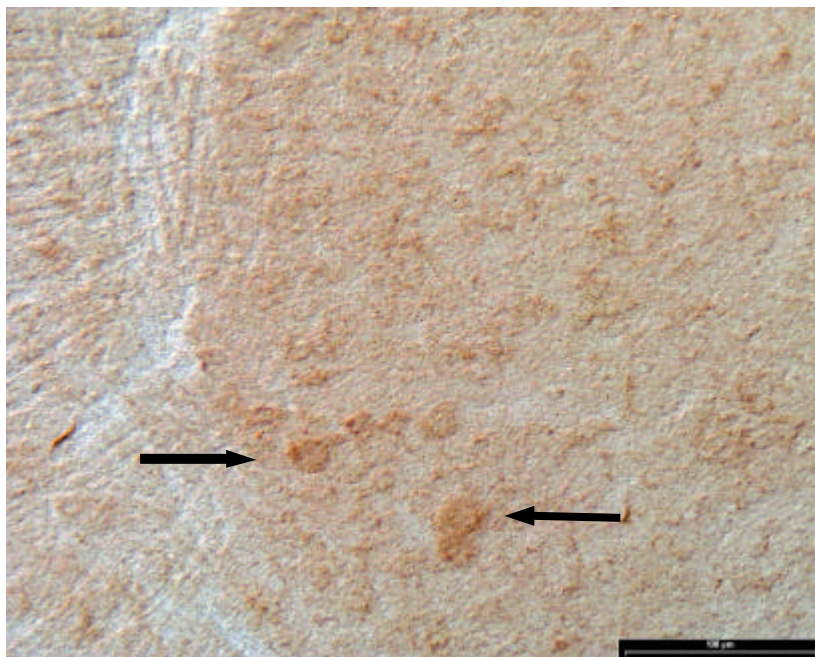


Abb. 32: SHBG-Färbung des Periaqueductalen Graus
Immunreaktive Zellen
(Pfeile) eingelagert zwischen
immunreaktiven Fasern

Messbalken = 100µm

Im Locus coeruleus (Abb. 33) sowie in den umgebenden tegmental Kerngebieten zeigen sich vereinzelt SHBG-positive Fasern und Zellen, und auch im ventralen Anteil des Ncl. subcoeruleus sind vereinzelt Zellen angefärbt (vgl. Abb. 58 C).

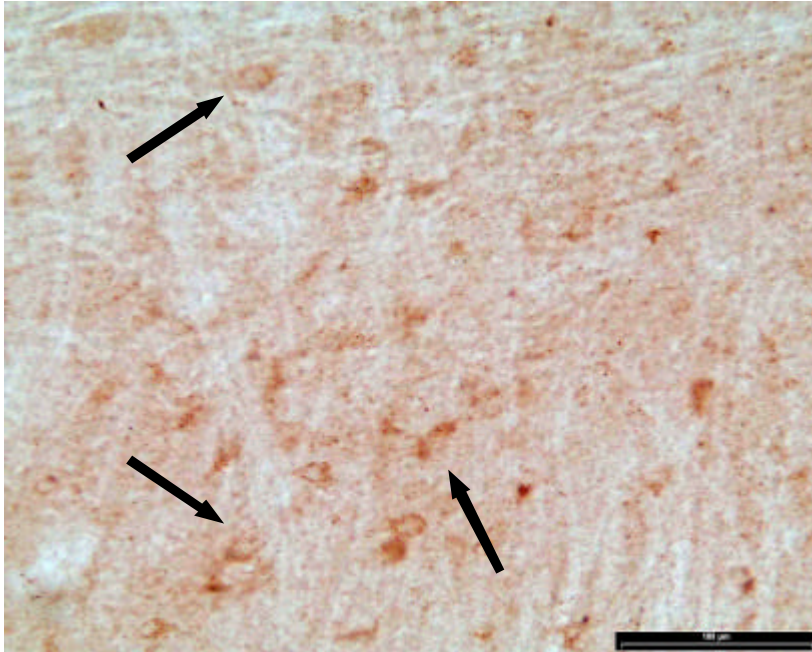


Abb. 33: SHBG-Färbung des Locus coeruleus
Immunoreaktive Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Der Ncl. ruber weist in seinem magnozellularären Teilgebiet immunoreaktive Zellen in hoher Dichte auf (Abb. 34) (vgl. Abb. 58 B).

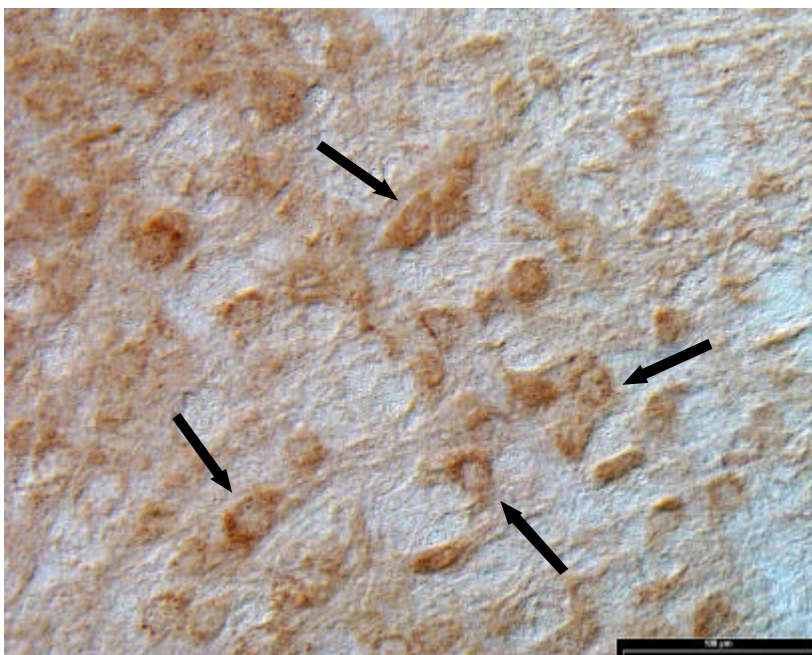


Abb. 34: SHBG-Färbung des Ncl. ruber, pars magnocellularis
Hohe Dichte von
immunoreaktiven Zellen
exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Ein Vorkommen von vereinzelten SHBG-positiven Zellkörpern ist im Kerngebiet des Ncl. interpenduncularis zu beobachten (vgl. Abb. 58 C).

Während weder die Pedunculi noch der Leminiscus medialis Immunreaktivität aufweisen, zeigt der Leminiscus lateralis immunoreaktive Zellen.

5.2.10 Motorische Hirnnervenkerne

Im Ncl. accessorius nervi (n.) oculomotorii (Abb.35) (vgl. Abb. 58 B), im Ncl. n. facialis (Abb.36) und auch im Verlauf des Nervus (N.) facialis (vgl. Abb.58 C) sind SHBG positive Zellkörper zu beobachten.

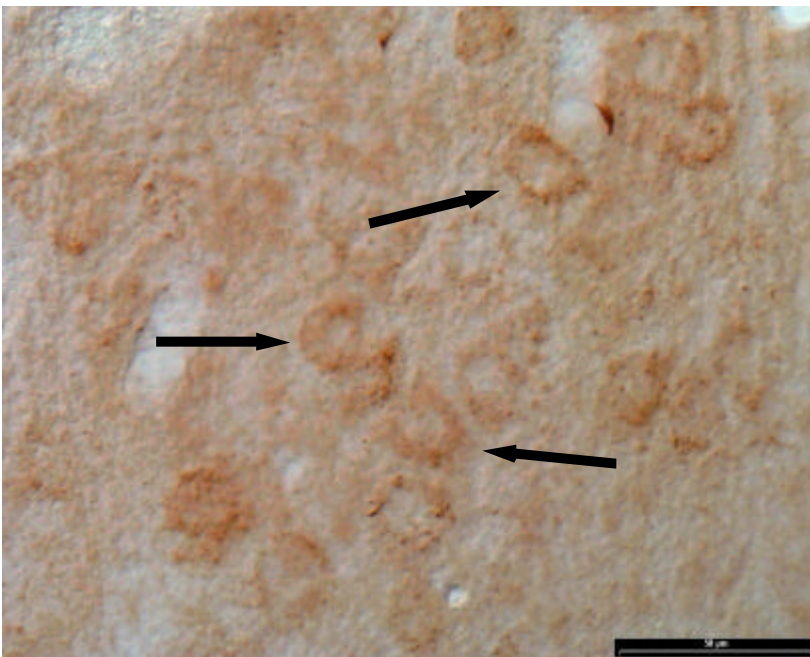


Abb. 35: SHBG-Färbung des Ncl. accessorius n. oculomotorii

Immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

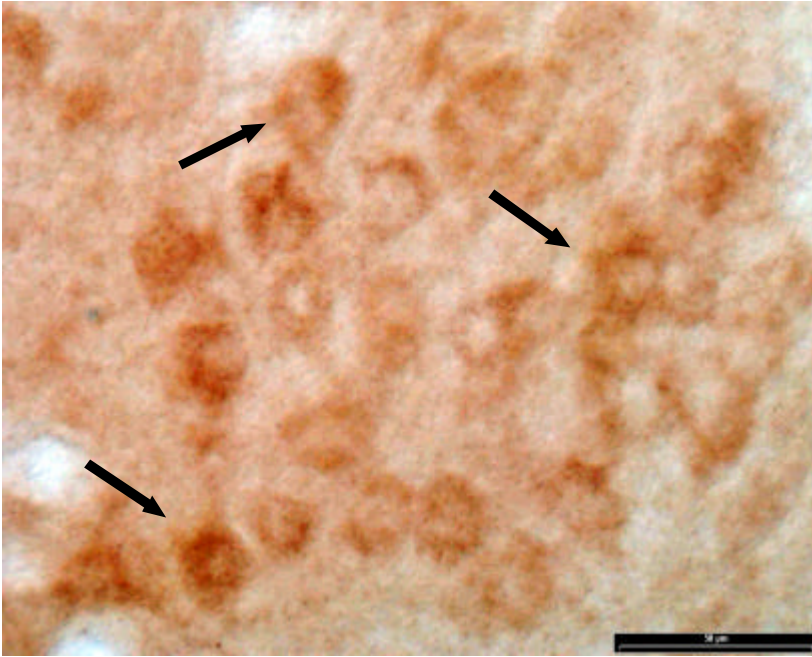


Abb. 36: SHBG-Färbung des Ncl. n. facialis
Immunoreaktive Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

Die Neurone des Ncl. n. vagus (Abb. 37) und des Ncl. ambiguus (Abb. 38) zeigen sich nur vereinzelt immunoreaktiv. Im letzteren Kerngebiet sind ebenfalls immunoreaktive Fasern nachweisbar.

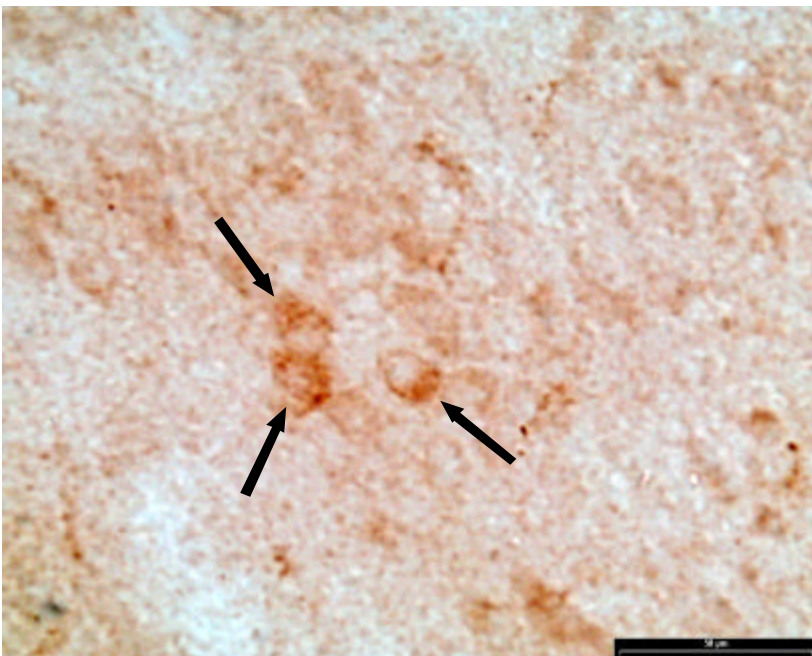


Abb. 37: SHBG-Färbung des Ncl. vagus
Vereinzelte immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

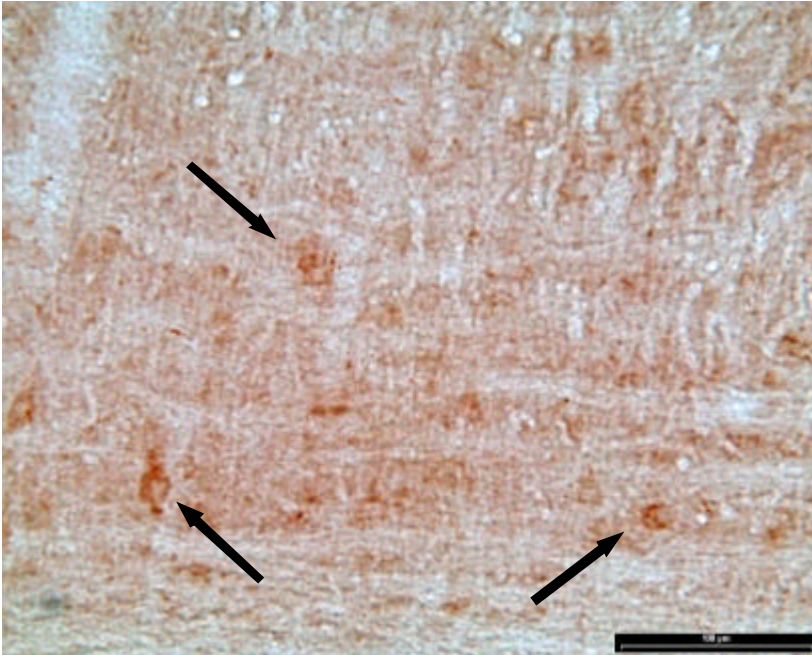


Abb. 38: SHBG-Färbung des Ncl. ambiguus

Immunoreaktive Zellen (Pfeile) in immunoreaktiven Fasern eingebettet

Messbalken = 100µm

5.2.11 Sensorische Hirnnervenkerne

Der Ncl. sensorius n. trigemini zeigt die höchste Dichte an SHBG-positiven Zellen unter den sensorischen Hirnnervenkernen (Abb. 39). Zelluläre Fortsätze erscheinen in seinem Kerngebiet hingegen ungefärbt.

Innerhalb der Ncll. vestibulares sind verschiedene Verteilungsmuster von SHBG deutlich unterscheidbar. Im lateralen Anteil des Kerngebietes zeigen sich Zellen in mittlerer Dichte, dagegen keine Fasern gefärbt (Abb. 40). Diese erscheinen im medialen Anteil stärker gefärbt, allerdings finden sich hier nur vereinzelt immunoreaktive Zellkörper (Abb. 41).

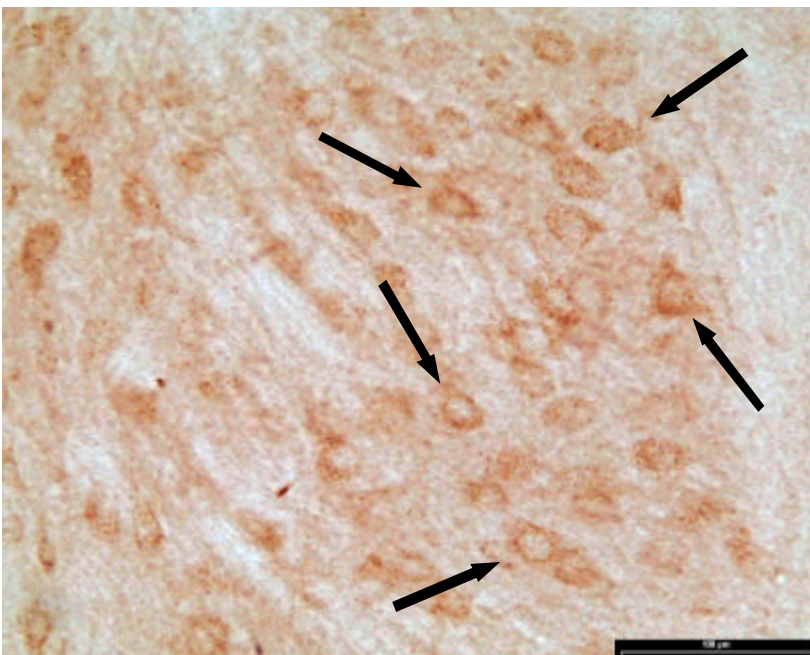


Abb. 39: SHBG-Färbung des Ncl. sensorius n. trigemini

Hohe Dichte immunoreaktiver Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

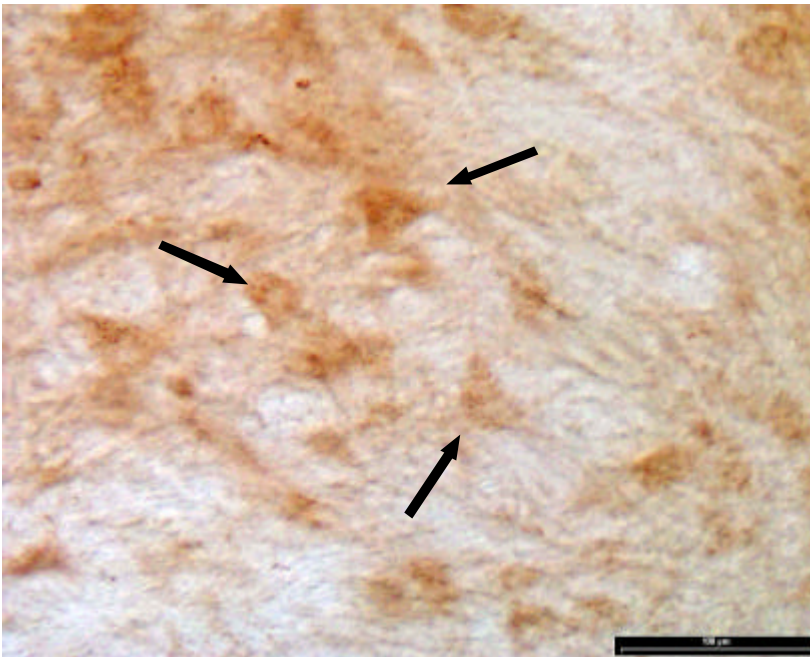


Abb. 40: SHBG-Färbung der Ncll. vestibulares, pars lateralis

Immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100μm

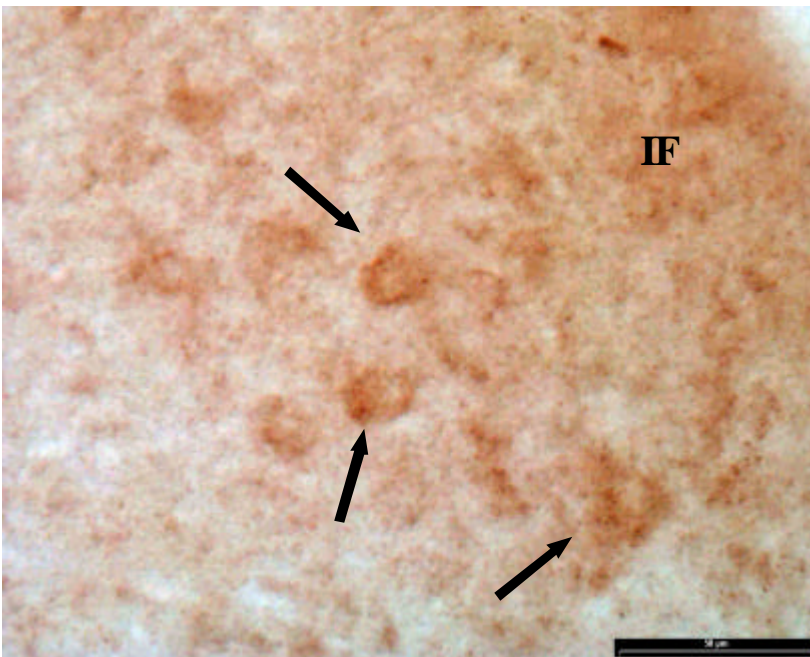


Abb. 41: SHBG-Färbung der Ncll. vestibulares, pars medialis

Vereinzelt immunoreaktive Zellen (Pfeile), immunoreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 50μm

Auch im Kerngebiet der Ncll. cochleares ist die SHBG-Verteilung nicht homogen.

Im dorsalen Anteil der Ncll. cochleares zeigen sich verstärkt immunoreaktive Fasern und nur wenige Zellen, im ventralen Anteil des Kerns hingegen zeigen sich vermehrt Zellen und die Dichte immunoreaktiver Fasern nimmt ab (Abb. 42) (vgl. Abb. 58 C).

Der N. vestibulocochlearis weist eine mäßige Dichte immunreaktiver Zellen auf, während zelluläre Fortsätze ungefärbt bleiben (Abb. 43) (vgl. Abb. 58 C).

In den Ncll. tractus solitarii finden sich vereinzelt große immunoreaktive Zellen.

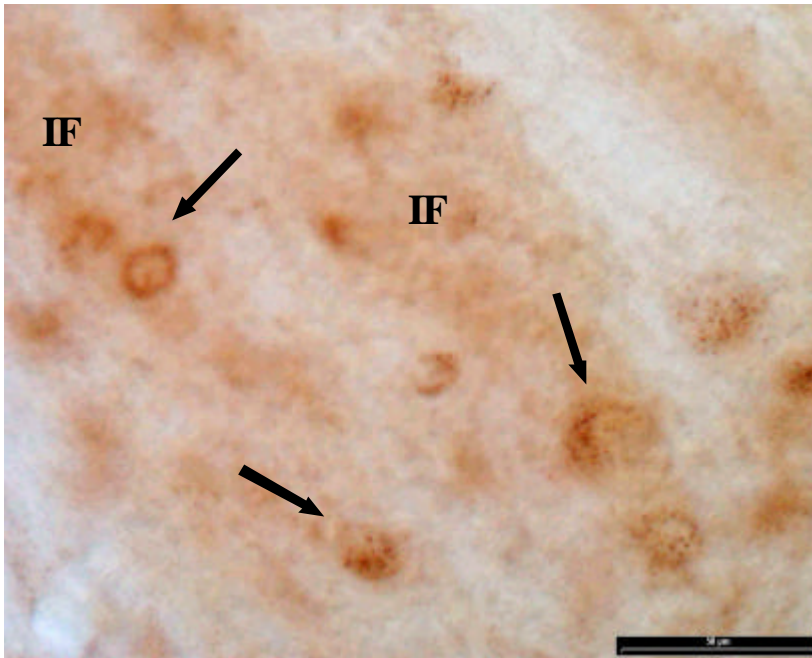


Abb. 42: SHBG-Färbung der Ncl. cochleares, pars ventralis

Immunoreaktive Zellen (Pfeile) in immunoreaktiven Fasern (IF)

Messbalken = 50µm

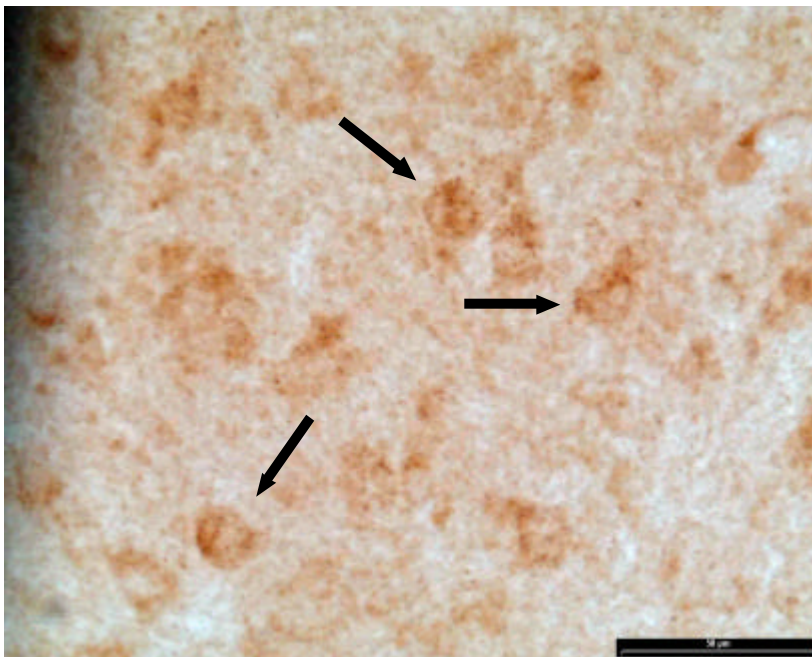


Abb. 43: SHBG-Färbung des N. vestibulocochlearis

Immunoreaktive Zellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50µm

5.2.12 Sensible Hirnnervenkerne

Der Ncl. mesencephalicus n. trigemini zeigt deutlich große Neurone angefärbt (Abb. 44) (vgl. Abb. 58 C). Der Ncl. spinalis n. trigemini hingegen weist keine Immunoreaktivität auf.

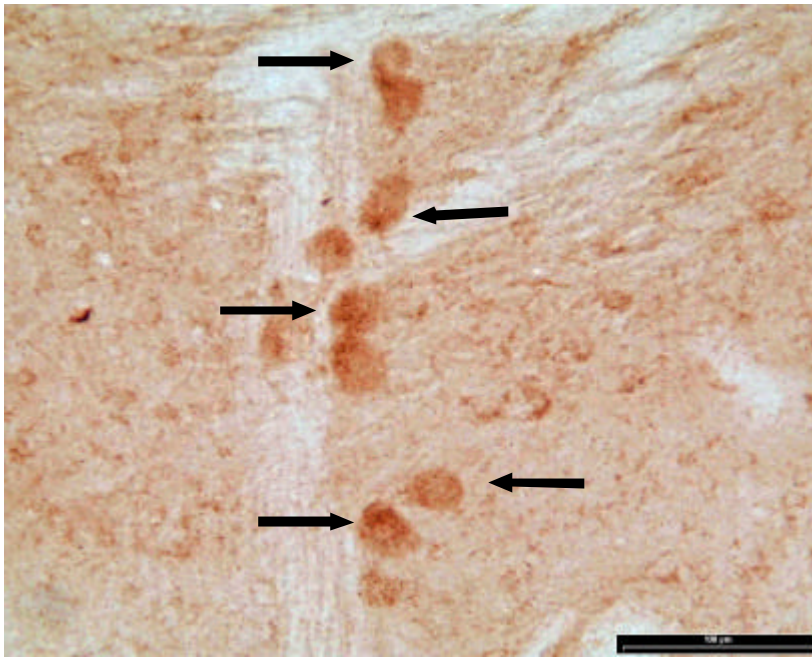


Abb. 44: SHBG-Färbung des Ncl. mesencephalicus n. trigemini

Immunoreaktive magnocelluläre Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messstab = 100µm

5.2.13 Olivenkerne

Die oberen und unteren Olivenkerne sind von immunreaktiven Fasern durchzogen, im lateralen Teilgebiet der oberen Oliven (Abb. 45) zeigen sich außerdem immunreaktive Zellen. Der Ncl. paraolivaris superior weist eine hohe Dichte an SHBG-positiven Zellen auf (Abb. 46) (vgl. Abb. 58 C).

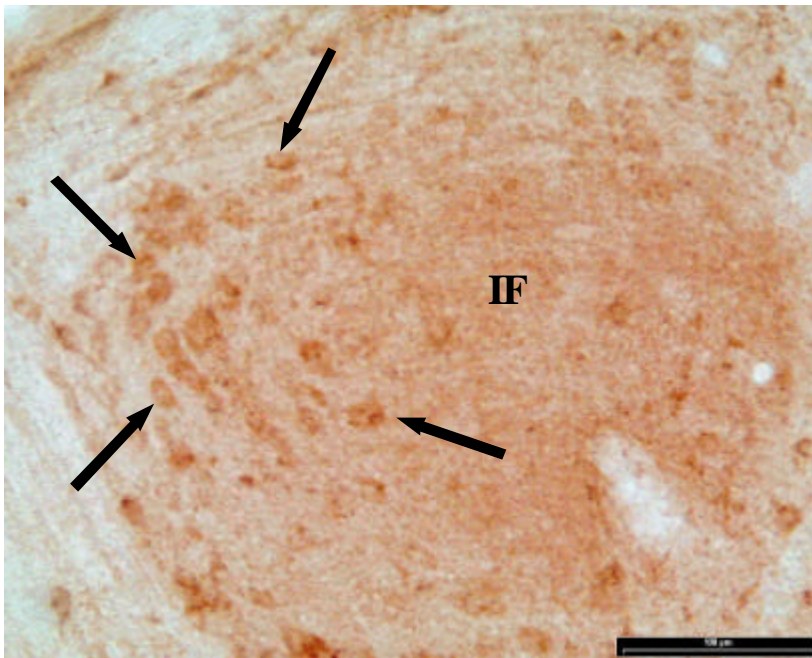


Abb. 45: SHBG-Färbung des Ncl. olivaris superior, pars lateralis

Immunreaktive Zellen (Pfeile), immunreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 100μm

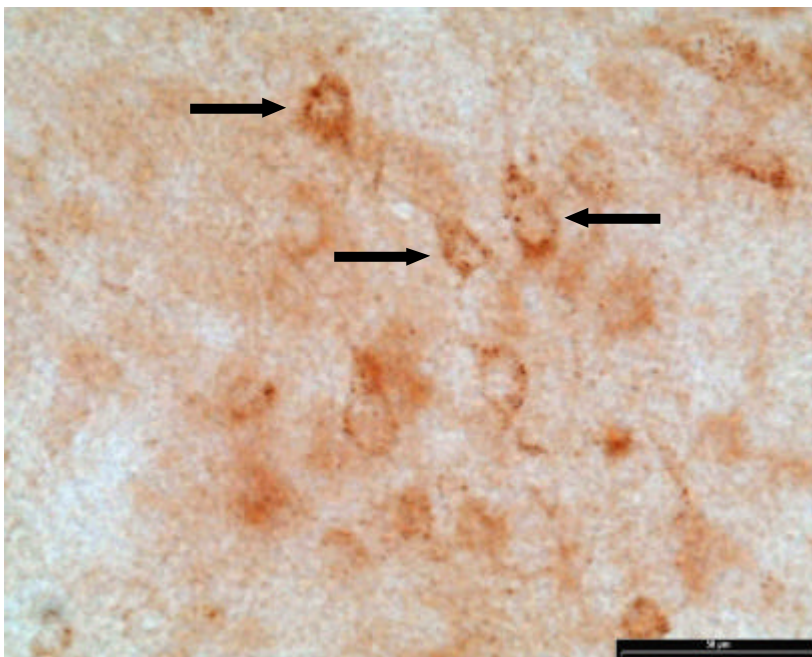


Abb. 46: SHBG-Färbung des Ncl. paraolivaris superior

Immunreaktive Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm

5.2.14 Brückenkerne

In den gesamten Brückenkernen finden sich immunoreaktive Zellen sowie Fasern. Anzahl und Dichte variieren, sind aber nicht immer auf bekannte anatomische Strukturen übertragbar (vgl. Abb. 58 B).

So weist der caudale Anteil der Ncll. reticulares pontis deutlich eine mittlere Dichte an SHBG-positive Zellen auf (vgl. Abb. 58 C) und im Ncl. reticulotegmentalis pontis (Abb. 47) findet sich eine hohe Dichte parvozellulärer immunoreaktiver Zellen. (vgl. Abb. 58 C).

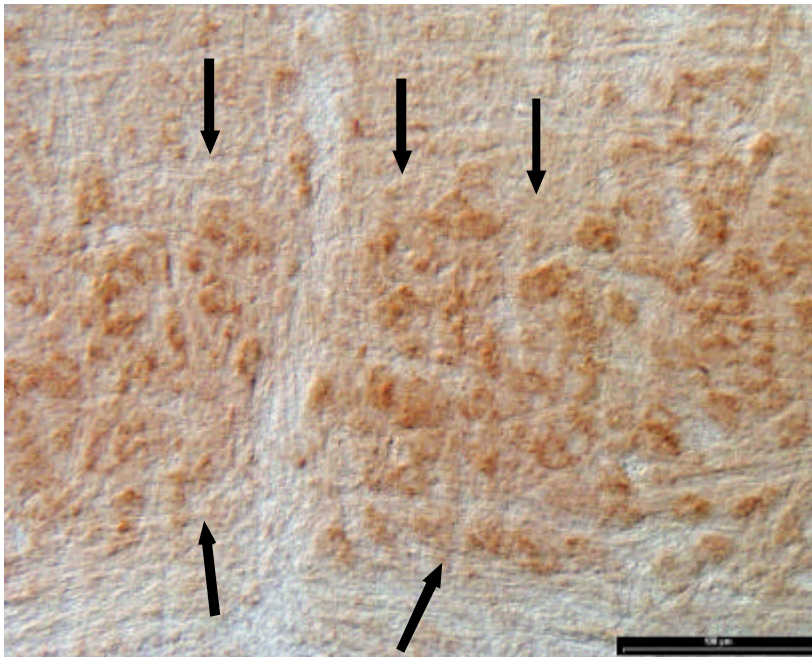


Abb. 47: SHBG-Färbung des Ncl. reticulotegmentalis pontis

Anhäufung immunoreaktiver parvozellulärer Zellen (Pfeile)

Messbalken = 100μm

Auch im Kerngebiet des Corpus trapezoideum herrscht eine hohe Dichte stark immunoreaktiver Zellen vor (Abb. 48) (vgl. Abb. 58 C).

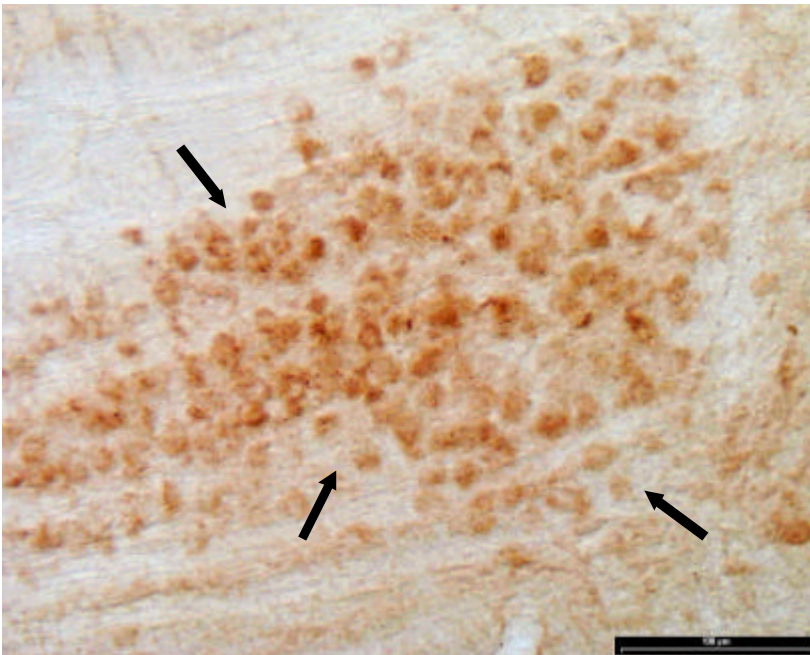


Abb. 48: SHBG-Färbung des Corpus trapezoideum
Anhäufung immunoreaktiver Zellkörper (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Im Ncl. parabrachialis finden sich immunoreaktive Fasern und Zellen, vermehrt im lateralen Teilgebiet (Abb. 49).

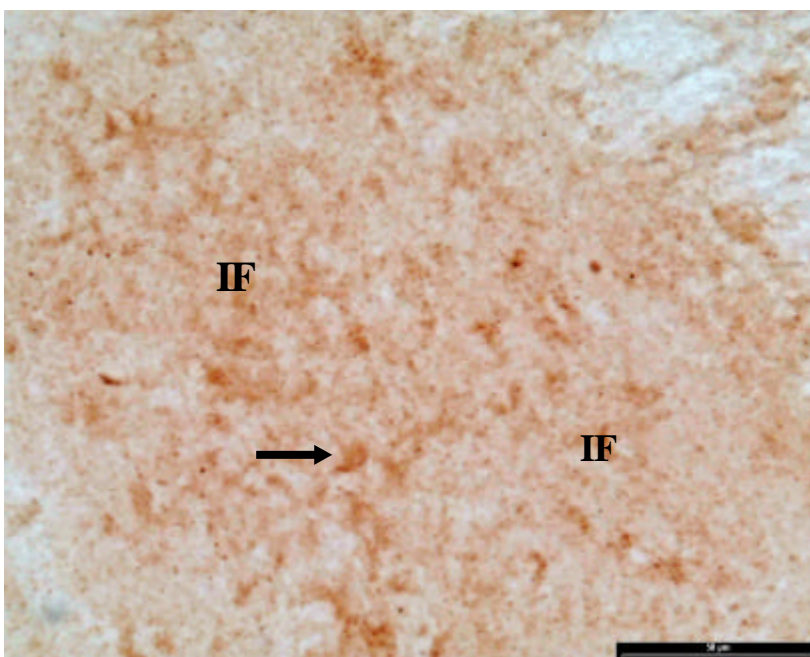


Abb. 49: SHBG-Färbung des Ncl. parabrachialis, pars lateralis
Immunoreaktive Fasern (IF) und vereinzelt immunoreaktive Zellen (Pfeil)

Messbalken = 50µm

5.2.15 **Formatio reticularis**

In der *Formatio reticularis* findet sich in verschiedenen Gebieten Immunreaktivität für SHBG.

So sind im zwischen der *Pars compacta* der *Substantia nigra* und dem *Ncl. ruber* gelegenen Teil immunreaktive Fasern (vgl. Abb. 58 B) zu beobachten.

Ungefähr auf der Höhe des *Colliculus superior* gelegen erscheinen sehr vereinzelt symmetrisch angeordnete große Neurone mit multiplen Ausläufern positiv für SHBG (Abb. 50). Sie sind nicht eindeutig einem bestimmten Kerngebiet zuzuordnen und ihre Gesamtanzahl liegt zwischen 14 und 20.

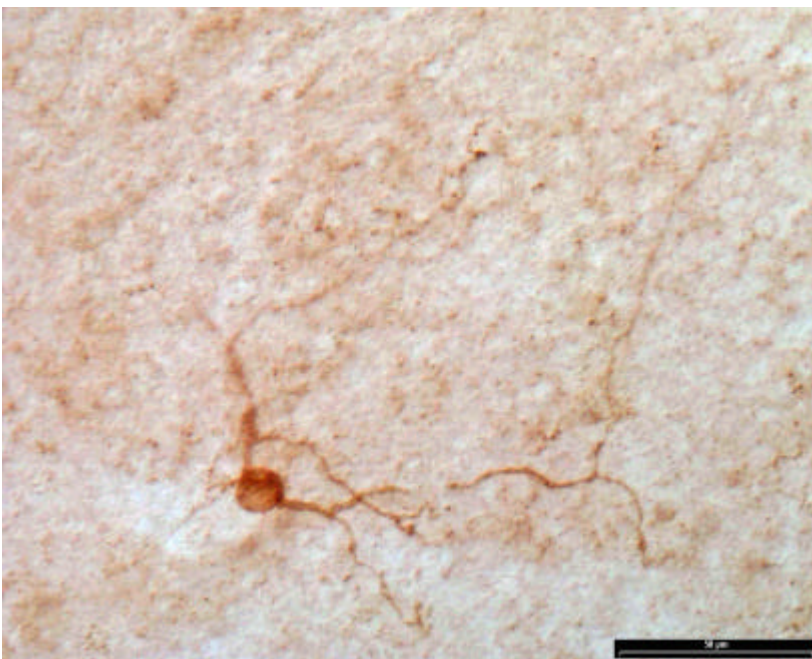


Abb. 50: SHBG-Färbung der *Formatio reticularis*
Immunreaktives Neuron mit weiten Ausläufern

Messbalken = 50µm

Desweiteren zeigen sich immunreaktive Fasern im zentralen Bereich des tiefen mesencephalischen Kerngebietes, die der motorischen Wurzel von III und IV entsprechen (vgl. Abb. 58 B).

Die Ncll. raphei hingegen weisen bis auf Zellen im Ncl. raphe magnus keine Immunoreaktivität auf (Abb. 51).

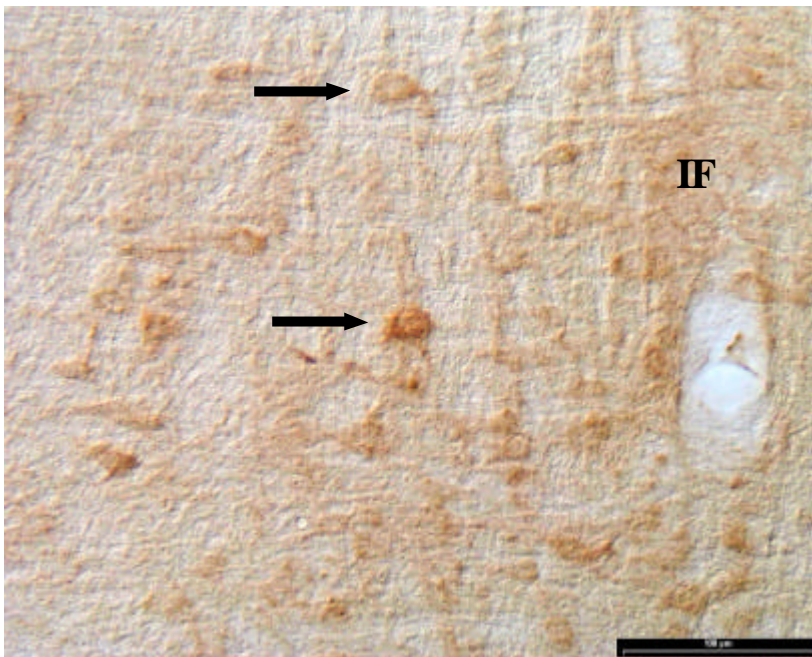


Abb. 51: SHBG-Färbung des Ncl. raphe magnus
Immunoreaktive Zellen (Pfeile) und Fasern (IF)

Messbalken = 100µm

5.2.16 Cerebellum

In den Kleinhirnkernen finden sich hohe Dichten an gefärbten Zellkörpern. Während es sich im Ncl. dentatus (Abb. 52) um parvocelluläre Neurone handelt, sind die gefärbten Zellen im Ncl. fastigii und im Ncl. globosus deutlich größer.

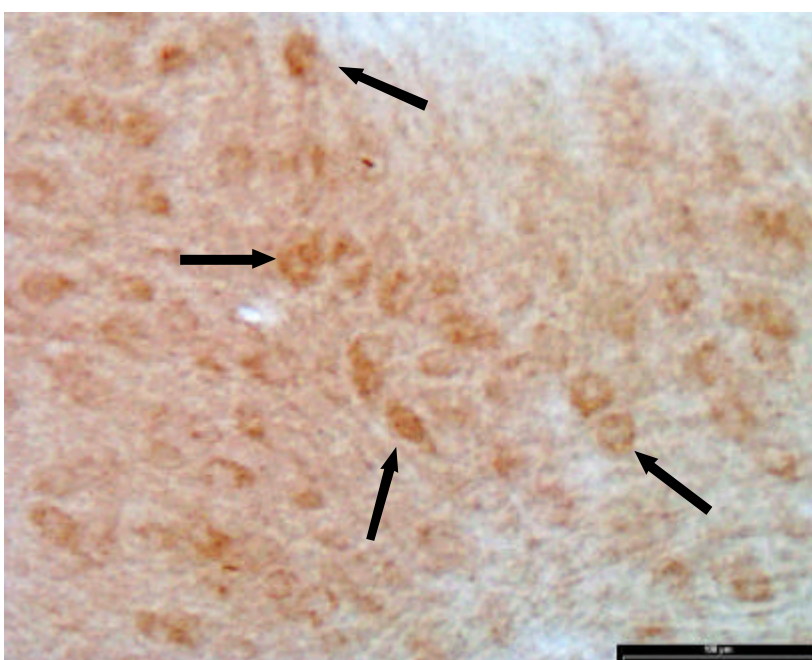


Abb. 52: SHBG-Färbung des Ncl. dentatus
Immunoreaktive parvocelluläre Zellkörper exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 100µm

Über den gesamten Cortex ist ein ähnliches Verteilungsmuster der Immunreaktivität zu beobachten. In der Körnerzellschicht sind sowohl Zellkörper als auch eine große Anzahl von Fortsätzen angefärbt (Abb. 53). Ebenso zeigt sich eine Teilklasse der Purkinjezellen deutlich immunoreaktiv (Abb. 54).

Durch den gesamten Vermis cerebelli ziehen SHBG-positive Fasern (Abb. 55).

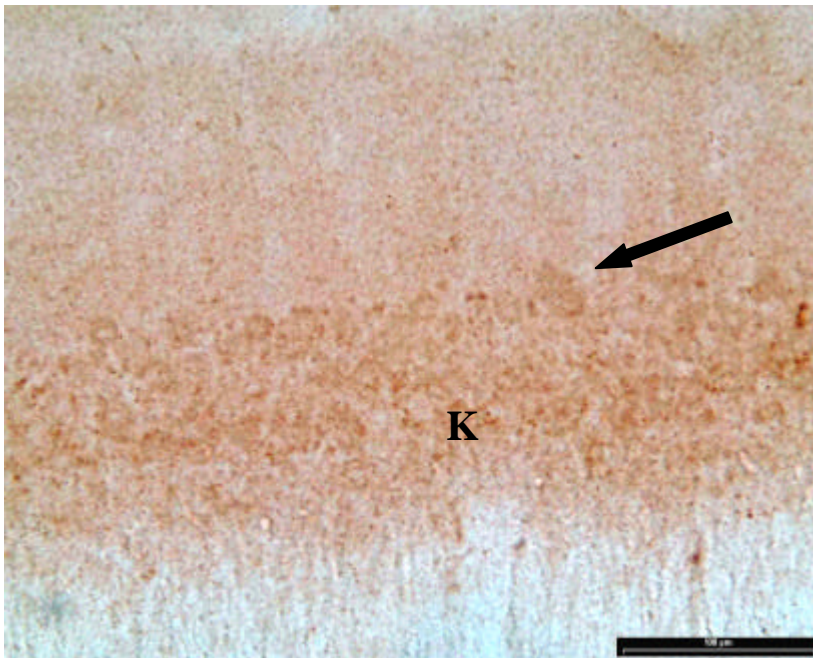


Abb. 53: SHBG-Färbung des Cortex cerebelli

Immunoreaktive Fasern und Zellkörper in der Körnerzellschicht (K) Purkinjezellen teilweise immunoreaktiv, exemplarisch markiert (Pfeil)

Messbalken = 100μm

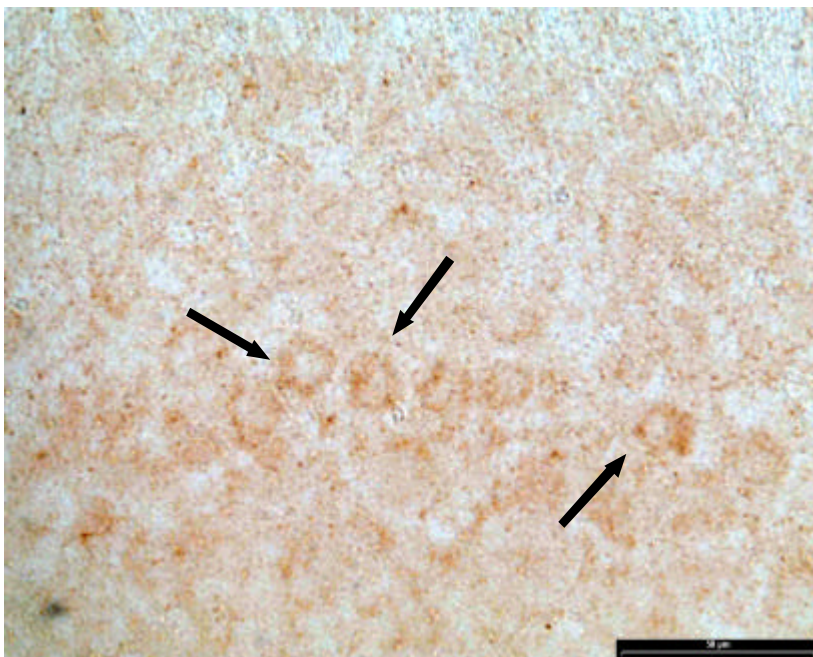
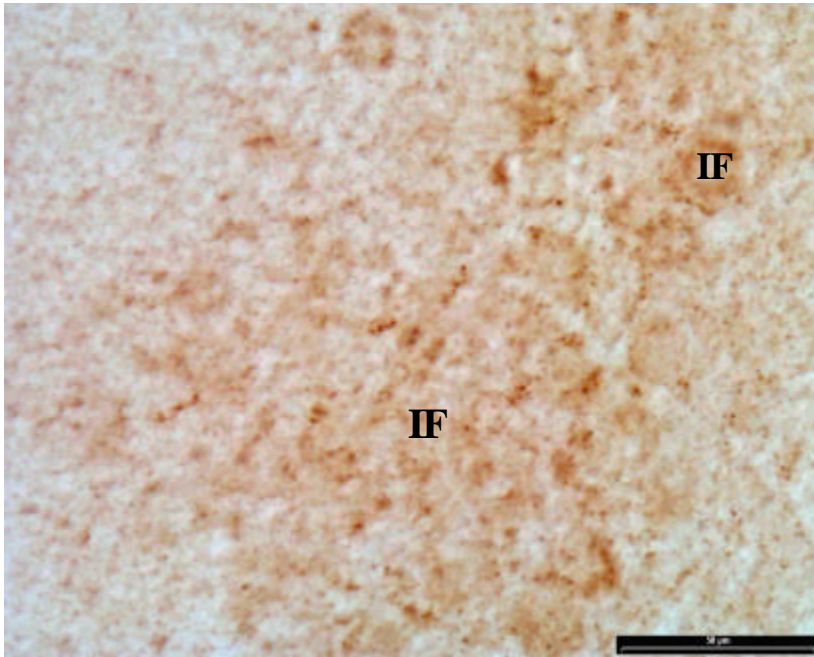


Abb. 54: SHBG-Färbung des Cortex cerebelli

Immunoreaktive Purkinjezellen exemplarisch markiert (Pfeile)

Messbalken = 50μm



**Abb. 55: SHBG-Färbung des
Vermis cerebelli**
Immunoreaktive Fasern (IF)

Messbalken = 50µm

5.3 Lokalisation von SHBG – schematische Darstellung

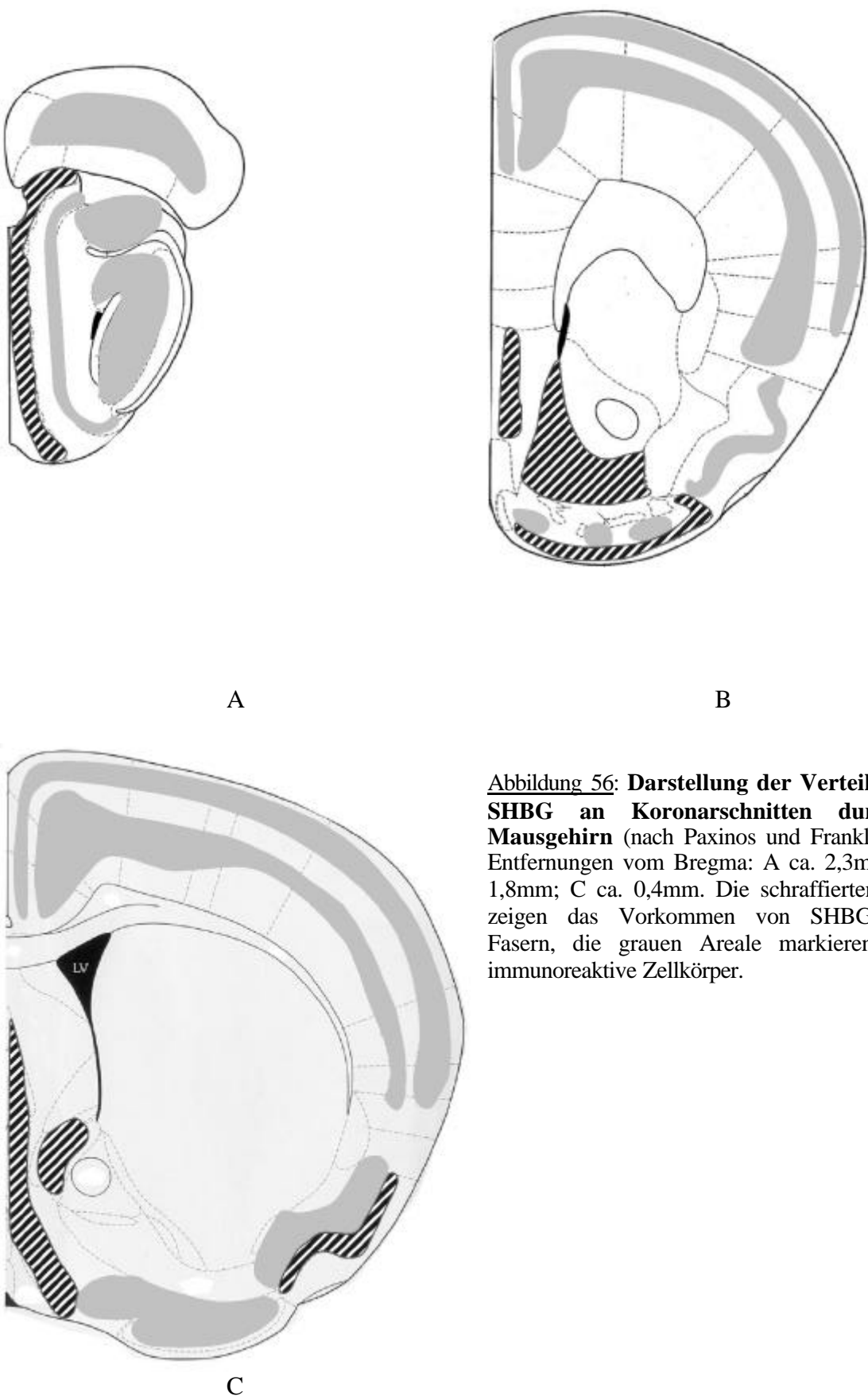


Abbildung 56: Darstellung der Verteilung von SHBG an Koronarschnitten durch das Mausgehirn (nach Paxinos und Franklin 1997). Entfernungen vom Bregma: A ca. 2,3mm; B ca. 1,8mm; C ca. 0,4mm. Die schraffierten Flächen zeigen das Vorkommen von SHBG-positiven Fasern, die grauen Areale markieren SHBG-immunoreaktive Zellkörper.

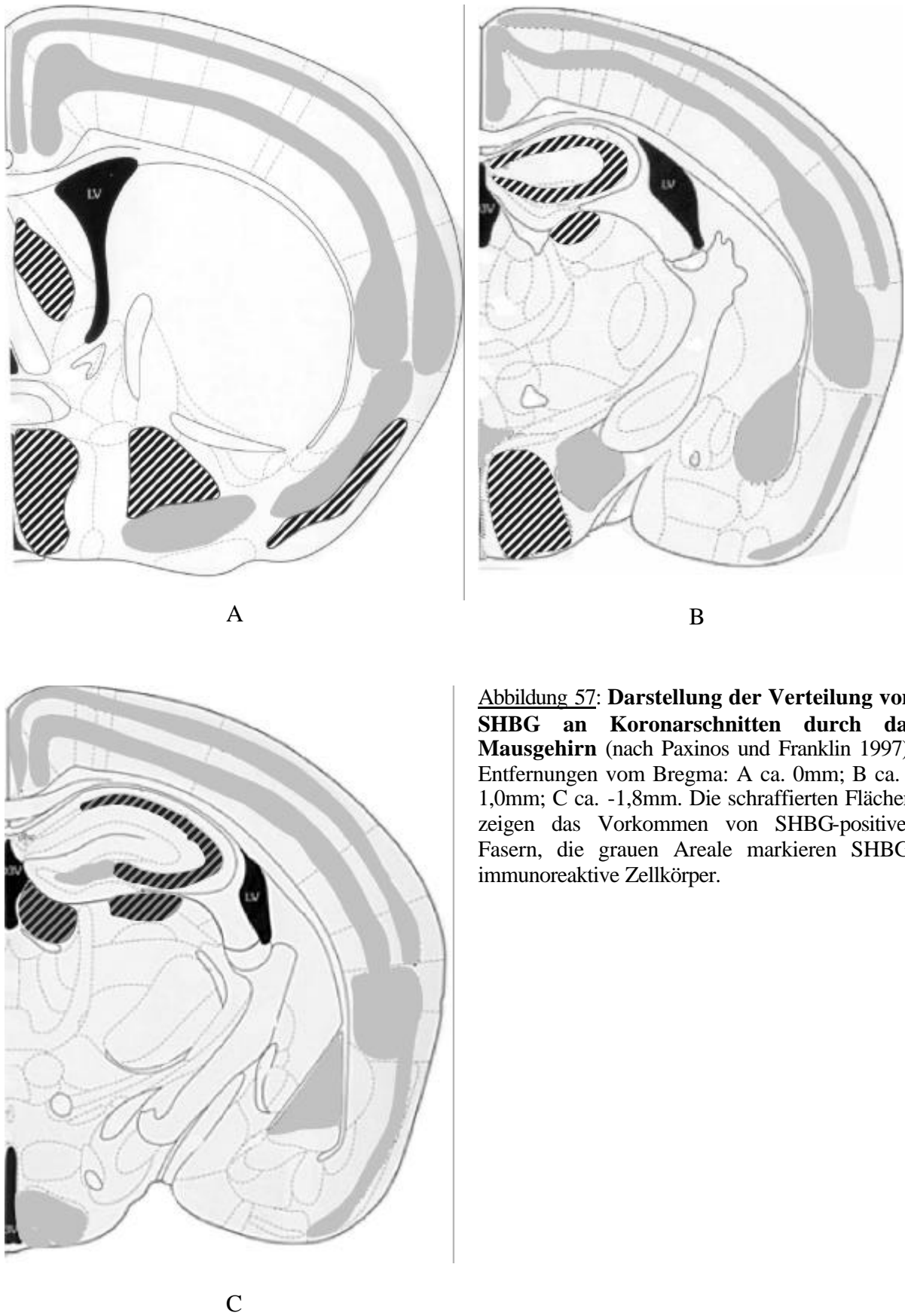


Abbildung 57: Darstellung der Verteilung von SHBG an Koronarschnitten durch das Mausgehirn (nach Paxinos und Franklin 1997). Entfernungen vom Bregma: A ca. 0mm; B ca. -1,0mm; C ca. -1,8mm. Die schraffierten Flächen zeigen das Vorkommen von SHBG-positiven Fasern, die grauen Areale markieren SHBG-immunoreaktive Zellkörper.

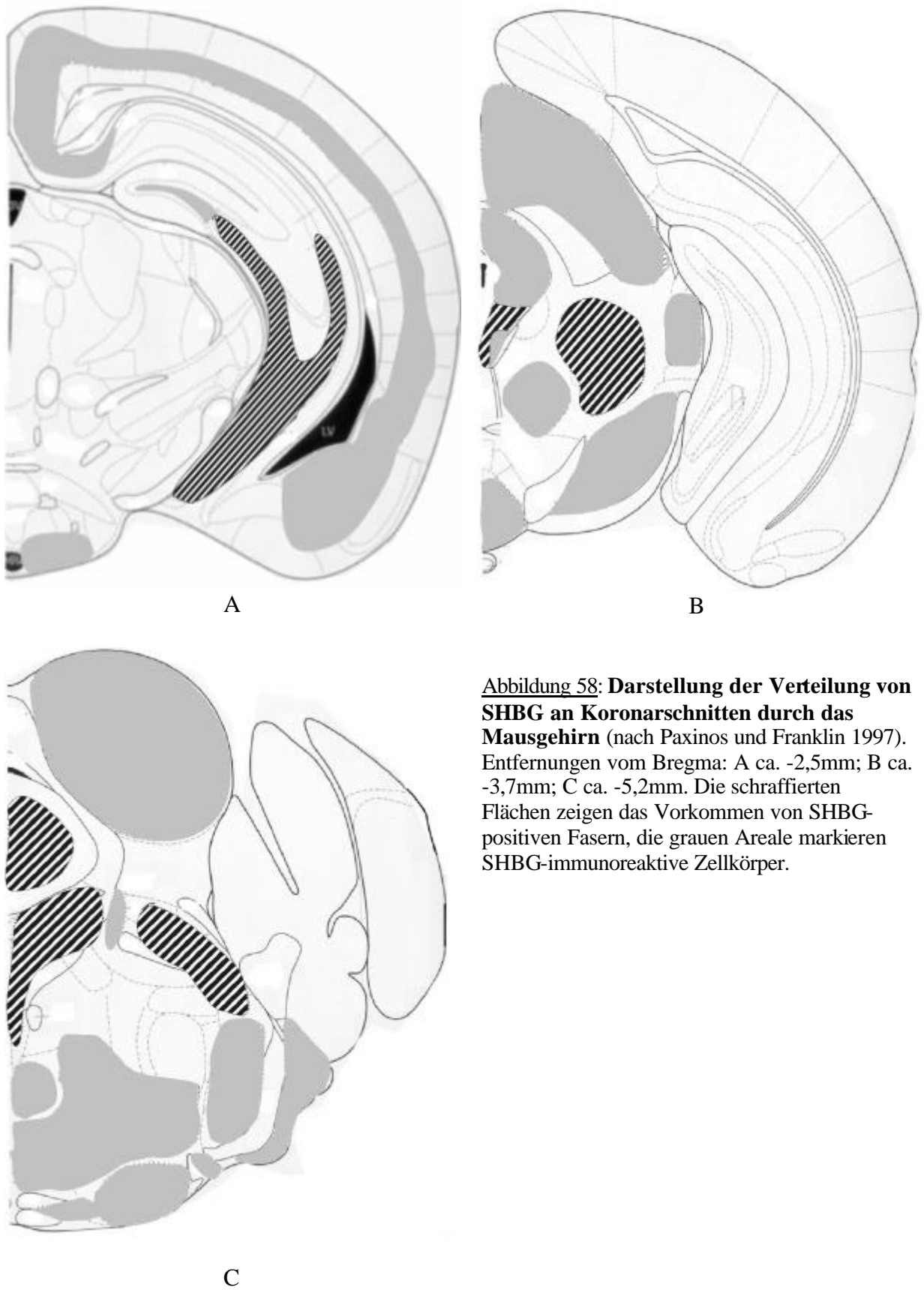


Abbildung 58: Darstellung der Verteilung von SHBG an Koronarschnitten durch das Mausgehirn (nach Paxinos und Franklin 1997).
Entfernungen vom Bregma: A ca. -2,5mm; B ca. -3,7mm; C ca. -5,2mm. Die schraffierten Flächen zeigen das Vorkommen von SHBG-positiven Fasern, die grauen Areale markieren SHBG-immunoreaktive Zellkörper.

5.4 Colokalisation von SHBG und ER ?

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung unterscheidet deutlich zwischen zytoplasmatischer Färbung des SHBGs und nuklearer Färbung der ER ? .

Durch die Schnittdicke von 100µm sind Zellkörper sowie zelluläre Fortsätze dargestellt.

Die Lokalisation von SHBG bestätigt die unter 5.2 beschriebenen Ergebnisse.

Auch die beobachtete ER?-Lokalisation ist in Veröffentlichungen bereits detailliert für das Gehirn der Maus beschrieben (Mitra et al. 2003).

Auffällig ist, dass in Arealen, in denen beide Substanzen nachgewiesen werden können, diese - bis auf eine Ausnahme - nicht in der selben Zelle lokalisiert sind. Vielmehr ergibt sich ein Bild der unmittelbaren Coexistenz von Zellen, die SHBG bzw. ER ? enthalten, nebeneinander, wie z.B. im Bed Ncl. striae terminalis (Abb. 59).

Eine Colokalisation in denselben Zellen findet sich ausschließlich im Hypothalamus im Ncl. ventromedialis (HVM) (Abb. 60).

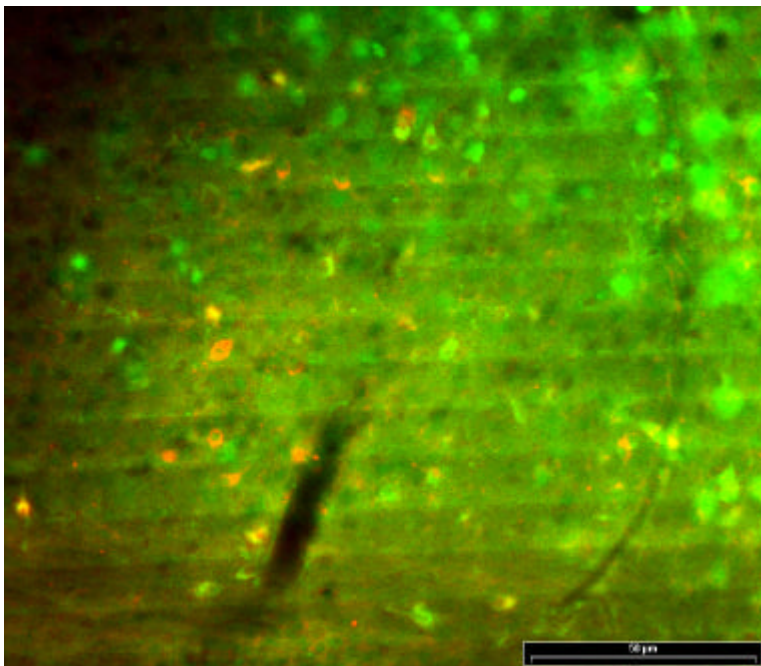


Abb. 59 SHBG und ER ?
Immunfluoreszenz-
Doppelfärbung des Bed Ncl.
striae terminalis
Coexistenz von Zellen mit
zytoplasmatischem SHBG
(rot) und Zellen mit nuklearen
ER ? (grün)

Messbalken = 50µm

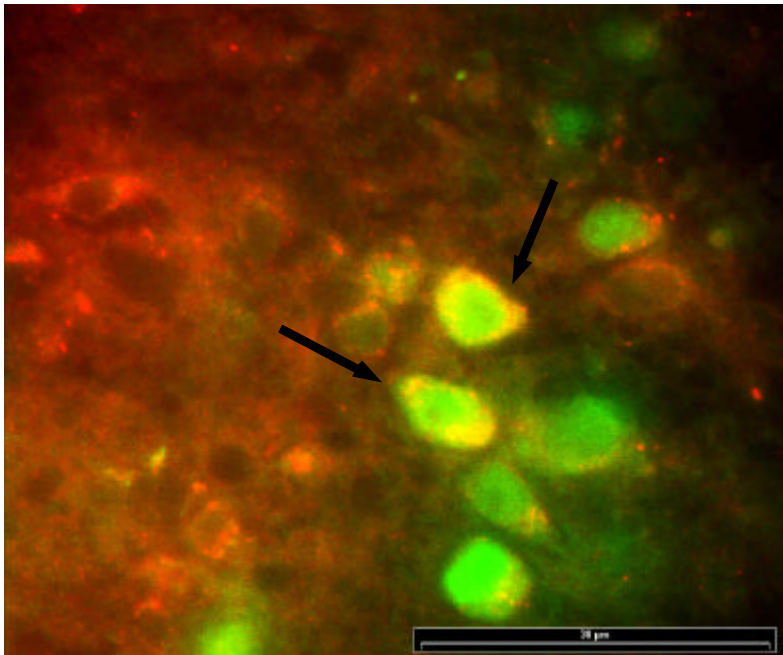


Abb. 60: SHBG und ER ?
Immunfluoreszenz-
Doppelfärbung des Ncl.
ventromedialis hypothalami
Colokalisation von
zytoplasmatischem SHBG
und nuklearen ER ? in Zellen
(exemplarisch mit Pfeilen
markiert)

Messbalken = 30µm

6 Diskussion

6.1 SHBG im Gehirn

Die vorliegende Arbeit ist die erste detaillierte topographische Lokalisationsbeschreibung von SHBG für das gesamte Gehirn der Maus.

Die Arbeitsgruppe um Wang berichtete bereits 1990 erstmals über die Expression von SHBG im Gehirn der Ratte (Wang et al. 1990). Daraufhin wurden verschiedene Arbeiten zur Lokalisation von SHBG erstellt. Diese beschränkten sich aber auf bestimmte Hirnareale der Ratte und des Menschen, meist auf den Hypothalamus (Herbert et al. 2003, Jirikowski et al. 2003, Herbert et al. 2005).

Aus den oben genannten Veröffentlichungen ist bekannt, dass Immunreaktivität für SHBG im Gehirn der Ratte sowohl in neuronalen Zellkörpern als auch in Fasern der Eminencia mediana des Hypothalamus vorkommt (Herbert et al. 2003). Außerdem gibt es Erkenntnisse über die Verteilung von SHBG und dessen Colokalisation mit anderen Proteinen oder Hormonen, wie z.B. Oxytocin oder Vasopressin im Hypothalamus der Ratte (Herbert et al. 2003, Jirikowski et al. 2005). Auch wurden in diesem Zusammenhang einige Studien über mögliche funktionelle Zusammenhänge von SHBG und Hormonexpression in diesem Gebiet veröffentlicht (Caldwell et al. 2003, Gao et al. 2003).

Im Gehirn der Ratte wurde mRNA für SHBG nachgewiesen (Wang et al. 1990). Das Molekulargewicht von SHBG mit 90 und 100kDa (Suzuki und Sinohara 1987) macht eine Passage der Blut-Hirn-Schranke unwahrscheinlich. Da aber die für SHBG kodierende RNA mit Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sowie mit insitu Hybridisierung sowohl im Gehirn der Maus (Gao et al. 2003) als auch in anderen Spezies (Herbert et al. 2005) beschrieben wurde, ist zu vermuten, dass das Protein auch hier produziert wird.

Diese Beobachtungen legen die Existenz eines intrinsischen SHBG-Systems nahe. Welche Funktion ein solches System im cerebralen Wirkungsgefüge ausübt bleibt weiterhin größtenteils offen.

Die genaue Bestimmung der Lokalisation von SHBG im gesamten Gehirn, wie sie in dieser Arbeit erstellt ist, könnte weitere Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge erschließen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf einer immunzytochemischen Färbemethode und der genauen mikroskopischen Auswertung. Funktionelle Daten wurden hier nicht erhoben.

In den Resultaten zeigt sich eine überraschend breite Verteilung von SHBG im gesamten Gehirn bei gleichzeitig hoher Selektivität. So findet sich Immunoreaktivität für SHBG anteilig in nahezu allen wichtigen funktionellen Wirkungssystemen des Gehirns, allerdings sind meist nur Teilgebiete bekannter anatomischer Strukturen spezifisch gefärbt. Außerdem fällt auf, dass das Vorkommen von SHBG auf keinen bestimmten Zelltyp beschränkt ist und auch viele zelluläre Fortsätze SHBG aufweisen. Dies könnte die Vermutung des axoplasmatischen Transports des Proteins unterstützen, wie er von der Gruppe um Herbert (Herbert et al. 2006) beschrieben wurde. Ein axonaler Transport des Steroid-bindenden Globulins könnte die Freisetzung des Proteins an Terminalen zur Folge haben. Daraus könnten sich neue Erkenntnisse über die SHBG-Funktion erschließen, so könnte SHBG parakrin, neuroendokrin oder/und als Transmitter wirken.

6.2 Lokalisation von SHBG im Gehirn und Überlegungen zu seiner Funktion

6.2.1 Limbisches System

Zum Limbischen System (LS) gehören mehrere Gehirnstrukturen, die als funktionell zusammengehöriges System u.a. Einfluss auf emotionale und vegetative Parameter ausüben und eine wichtige Rolle für Motivation, Antrieb, Lernen und vermutlich auch weitere kognitive Leistungen spielen (Nieuwenhuys 1996, Sitho und Tien 1997).

SHBG-Immunreaktivität im LS ist in Rahmen dieser Arbeit am intensivsten in Zellkörpern des Subiculus und im Hippocampus in Faserschichten des Cornu ammonis CA1, CA2 und CA3 nachgewiesen. In der polymorphen Schicht des benachbarten Gyrus dentatus zeigen sich ebenfalls SHBG-positive Zellen.

Funktionell ist das Subiculum eine Zwischenstation für Afferenzen aus dem Neocortex, die als Feedback-Information an den Hippocampus weitergeleitet werden (Nieuwenhuys 1996). Es spielt eine wichtige Rolle bei der räumlichen Orientierung, beim Gedächtnis und bei der Kontrolle der Stressreaktion (O'Mara 2005). In den Bereichen CA1 bis CA3 befinden sich Pyramidenzellen in verschiedener Dichte, die hier – vergleichbar mit den Pyramidenzellen im Neocortex – das efferente System des Archikortex bilden. Zusammen mit dem Gyrus dentatus bildet das Ammonshorn ein Regulationszentrum, das Signale aus nahezu allen sensorischen und assoziativen Cortexarealen integriert und reziprok beeinflusst. Außerdem wirkt es modulatorisch auf subkortikale Regionen wie Hypothalamus und Formation reticularis und nimmt so Einfluss auf Triebverhalten und Vigilanz (Amaral und Insausti 1990).

Der Gyrus dentatus ist ein Teil des Hirns, welcher ein Leben lang in der Lage ist, neue Neurone zu produzieren (McEwen und Alves 1999). Es ist beschrieben, dass diese Neurogenese unter dem Einfluss von Estrogenen steht (Tanapat et al. 1999).

Eine genaue histochemische Charakterisierung der Hippocampusneurone wurde nicht durchgeführt. Die hier beobachtete Immunfärbung schließt daher Pyramidenzellen und wahrscheinlich auch Interneurone ein. Möglicherweise enthalten auch einige Korbzellen SHBG.

Ebenfalls SHBG-positiv zeigen sich Zellen und Fortsätze in den basalen und basolateralen Anteilen der Amygdala und im Ncl. des diagonalen Bandes nach Broca.

Der Ncl. des diagonalen Bandes nach Broca steht über septale Faserzüge, von denen sich speziell die Fasern des Septum praeopticum für SHBG positiv anfärben, in Verbindung mit dem Hippocampus (Bleier und Byne 1985).

Auch das Corpus amygdaloideum steht sowohl afferent als auch efferent mit dem Hippocampus in Verbindung. Desweiteren erhält es Afferenzen aus nahezu allen sensorischen Systemen. Es wird vermutet, dass es mit seinen reziproken Verbindungen zwischen verschiedenen Strukturen des Paleo- und Archicortex u.a. als eine Umschaltstelle zwischen dem LS und dem Riechsystem fungiert (Mc Gaugh et al. 1996). Dem Mandelkörper wird eine große Rolle bei der Bildung emotionaler Gedächtnisinhalte zugeschrieben (Morris et al. 1996, Mc Gaugh et al. 1996, Thompson und Kim 1996).

Es ist bekannt, dass Estrogene einen großen Einfluss auf viele Funktionen haben, zu denen Strukturen des LS beitragen. Sie beeinflussen das emotionale Befinden (Kimura 1992, Douma et al. 2005) und werden in der Therapie depressiver Erkrankungen angewandt (Zhao et al. 2005). Auch das Gedächtnis steht unter dem Einfluss von Steroiden (Sherwin 1994). So wurde in Tierversuchen u.a. eine Veränderung der Gedächtnisleistung bei ovariectomierten Ratten beobachtet (Singh et al. 1994). Desweiteren wird der Estrogengehalt mit der Pathogenese des Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht (Saenz et al. 2005).

Da bei weiblichen Alzheimer-Patienten ebenfalls signifikant höhere SHBG-Spiegel nachgewiesen werden konnten (Hoskin et al. 2004), liegt es nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen SHBG und Estrogenen in Bezug auf Morbus Alzheimer gibt.

Dies ist nur eine der möglichen Schnittstellen von SHBG- und Estrogenfunktion im LS.

Insgesamt erscheint auffällig, dass die in dieser Arbeit beschriebene Lokalisation des SHBGs innerhalb des LS nur eine teilweise Überlappung mit den Gebieten zeigt, in denen mittels in-

situ Hybridisierung die mRNA der klassischen ER nachgewiesen werden konnte (Shughrue et al. 1997, Lafamme et al. 1998). Auch die mittels Immunzytochemie ermittelte Lokalisation von ER α (Perez et al. 2003) deckt sich nur in Teilen mit dem Vorkommen von SHBG. So wurden beispielsweise für Subiculum, welches in dieser Arbeit eine hohe Dichte von SHBG aufweist, keine ER α und nur in geringer Anzahl ER β beschrieben. Das Cornu ammonis hingegen zeigt Immunreaktivität sowohl für ER α als auch für SHBG (Perez et al. 2003).

Diese nur begrenzte Deckung des Vorkommens von SHBG und der klassischen ERs im LS legt nahe, dass SHBG seine Funktion im LS zum einen in Zusammenarbeit oder Ergänzung mit den klassischen ER, zum anderen unabhängig von ihnen ausübt.

Das Vorkommen von SHBG in kommunizierenden Kerngebieten und in deren verbindenden Faserzügen lässt vermuten, dass das Protein innerhalb des LS eine Rolle bei der Vermittlung von Informationen spielt. Die immunreaktiven Fasern können einen Hinweis auf axonalen Transport von SHBG sein (Herbert et al. 2003 und 2006).

6.2.2 Hypothalamus

In dieser Arbeit wurde im Hypothalamus der Maus im Vergleich zu anderen Spezies wie z.B. Mensch und Ratte (Jirikowski 2003, Herbert et al. 2005) ein relativ geringeres Vorkommen von SHBG beobachtet. Dies könnte durch die fehlende Colchizin-Behandlung der Tiere begründet sein und somit ein Hinweis auf einen sehr schnellen Umsatz von SHBG in diesem Gebiet sein. Dennoch finden sich spezifisch gefärbte Teilgebiete, wobei es sich sowohl um die Färbung magnozellerärer und parvozellärer Neurone als auch zellulärer Fortsätze handelt.

Im Kerngebiet des Hypothalamus sind lebenswichtige Funktionen vereinigt, da es die relativ autonomen vegetativen Steuerungszentren des zentralen Nervensystems enthält (Bruesch 1984). Zum einen steuert der Hypothalamus über hormonale Efferenzen die peripheren endokrinen Drüsen, zum anderen greift er über nervale Efferenzen in die Regulation von den durch Sympathikus und Parasympathikus gesteuerten Mechanismen ein (Arancibia et al. 1996, Coote 1995). Auf diese Weise beeinflusst er z.B. die Nahrungs- und Wasseraufnahme, Wärmeregulation, Fortpflanzungs- und Schlafverhalten (Woods et al. 1998, Arancibia et al. 1996, Smith und DeVito 1984, Moore 1997).

Im vorderen Kerngebiet des Hypothalamus befinden sich zwei magnozelleräre Kerngebiete, Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus, deren Hauptaufgabe darin besteht, die

Neurohormone Oxytocin und Vasopressin zu produzieren (Swaab 1997). Diese werden über die Eminentia mediana in die Neurohypophyse transportiert (Bruesch 1984, Swaab 1997).

SHBG findet sich im Mausgehirn in magnozellulären Neuronen und zellulären Fortsätzen des Ncl. paraventricularis, wohingegen der Ncl. supraopticus keine Immunoreaktivität aufweist. In der Innen- und der Außenzone der Eminentia mediana ist eine große Dichte SHBG-positiver Faserzüge nachweisbar.

SHBG wurde sowohl in Ratten als auch im Menschen in beiden magnozellulären Kerngebieten und der Eminentia mediana nachgewiesen (Wang et al. 1990, Herbert et al. 2005). Die Gruppe um Herbert beschreibt SHBG in Herringkörpern der Neurohypophyse und eine partielle Colokalisation von SHBG und Oxytocin sowohl in den magnozellulären Neuronen als auch in den Herringkörpern (Herbert et al. 2003). Die Colokalisation von SHBG mit Vasopressin wurde in diesem Gebiet ebenfalls beschrieben (Jirikowski et al. 2005). Mittels Immun-Goldfärbung wurden SHBG- und Oxytocin-gefüllte Vesikel in den in die Eminentia mediana ausstrahlenden zellulären Fortsätzen dargestellt (Herbert et al. 2006). Diese Beschreibungen, zusammen mit der SHBG-Verteilung im Mausgehirn, unterstützen die Hypothese, dass SHBG neben Oxytocin (und Vasopressin) ein zusätzliches neurohypophyseales Hormon darstellt, welches im Hypothalamus produziert, über die Außenzone der Eminentia mediana axonal transportiert und in der Neurohypophyse ausgeschüttet wird.

Die Innenzone der Eminentia mediana enthält Efferenzen der parvozellulären Neurone des Ncl. paraventricularis, die hier Kontakt zum adenohipophysären Pfortadersystem haben und Releasinghormone ausschütten. Es ist denkbar, dass SHBG in der Eminentia mediana auch in den Pfortaderkreislauf gelangt und auf den Hypophysenvorderlappen wirkt (Herbert et al. 2003).

Der Ncl. arcuatus sowie das Tuber cinereum gelten als wichtige Produktionsstätten für hypothalamische Releasinghormone, die über das hypophysäre Pfortadersystem der Eminentia mediana in die Adenohipophyse weitergeleitet werden (Bruesch 1984, Swaab 1997).

Im Mausgehirn weist der Ncl. arcuatus eine hohe SHBG-Dichte in seinen parvozellulären Neuronen auf, im Tuber cinereum findet sich SHBG vermehrt in Fasern. Hier liegt die Vermutung nahe, dass SHBG – ähnlich wie ein Releasing Hormon – intrinsisch produziert wird und über die ebenfalls SHBG-positive Eminentia mediana weiter in die Adenohipophyse transportiert wird. Der Ncl. arcuatus enthält bei der Maus eine hohe Dichte

Estradiol-rezeptiver Nervenzellen (Stumpf et al. 1975). Eine Teilklasse dieser Zellen produzieren β -Endorphine (Jirikowski et al. 1986).

Auch in Fasern des Organum subfornicale ist eine hohe Dichte von SHBG zu beobachten. Dieses Organ gilt als Lagerstelle für Releasinghormone, die in Vesikeln innerhalb axonaler Endigungen immunozytochemisch bewiesen wurden (Swaab 1997).

Zusammenfassend ist auffällig, dass die Lokalisation von SHBG in diesem Gebiet der von einem Releasing-Hormon entspricht. Es ist daher zu vermuten, dass das Protein dementsprechend auch eine Releasing-Faktor-ähnliche Funktion erfüllen könnte.

Das Vorkommen von SHBG in den Kerngebieten des Ncl. suprachiasmaticus, Ncl. periventricularis, Area praeoptica, Ncl. praemammillaris und Ncl. ventromedialis, wie es in dieser Arbeit nachgewiesen ist, wurde ebenfalls für die Ratte beschrieben (Wang et al. 1990, Herbert et al. 2003).

Dieser nicht-neuroendokrine Anteil des Hypothalamus steht über neuronale Verbindungen afferent und efferent mit Teilen des LS, des Cortex und auch des Hirnstamms in Verbindung (Holstege 1987, Risold et al. 1997). Er steuert neben dem zirkadianen Rhythmus und der Regulation der Körpertemperatur Funktionen, die unter „Selbsterhaltung und Reproduktion“ zusammengefasst werden können (Moore 1997, Arancibia et al. 1996, Smith und DeVito 1984).

Funktionelle Studien haben den Einfluss von SHBG im Hypothalamus bewiesen. So beschreibt die Gruppe um Caldwell gesteigerte sexuelle Bereitschaft bei weiblichen Ratten unter SHBG-Gabe in die Area praeoptica (Caldwell et al. 2000). Aus diesen Studien, verbunden mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die ein sehr spezifisches Vorkommen von SHBG im Hypothalamus beweist, ergibt sich, dass das Protein in dieser Hirnregion eine autonome Funktion auszuüben scheint.

Die Neurone der praeoptischen Region enthalten ebenfalls zahlreiche Estrogenrezeptoren (Stumpf et al. 1975). Ein Zusammenhang von Estrogenen und SHBG in dieser Region ist untersucht. Eine Studie von Gao beweist eine dramatische Reduktion von SHBG-mRNA und des SHBG-Proteinspiegel nach der Gabe von Estradiol sowohl im Hypothalamus als auch in der Neurohypophyse (Gao et al. 2003). Es erscheint möglich, dass die Estrogene als eine Art Modulator eine Kontrollfunktion für die Sekretion von SHBG an diesen Stellen ausüben.

6.2.3 Hirnstammfunktionen

Der Hirnstamm beherbergt die Mehrheit der Hirnnervenkerne sowie deren Verschalt- und Koordinationsstellen (Daniels et al. 1997). In der *Formatio reticularis* (FR) sind die lebenswichtigen vegetativen Zentren, wie z.B. das Atem-, Kreislauf-, Brech- oder Weckzentrum lokalisiert (Langhorst et al. 1986, Miller und Leslie 1994, Ramirez und Richter 1996). Außerdem sind im Hirnstamm verschiedene Kerngebiete angesiedelt, die in Zusammenarbeit mit dem Kleinhirn wesentlich zur Koordination der Motorik beitragen (Welsh und Llinas 1997, Ruigrok 1997).

In dieser Arbeit konnte SHBG in Teilklassen von Neuronen der einzelnen Kerngebiete des Hirnstammes beobachtet werden. Die Markierung überlagert sich oft nur zum Teil mit der bekannten Cytoarchitektur.

Innerhalb der sensorischen Systeme im Mausgehirn zeigt sich ein hoher Gehalt an SHBG.

So ist SHBG in allen Strukturen der auditiven Wahrnehmung vertreten. Beginnend bei den Ncll. cochleares, die sowohl in ihren ventralen als auch dorsalen Anteilen immunreaktive Zellen und Fasern zeigen, findet sich weiterhin eine hohe Dichte in Neuronen des *Corpus trapezoideum*, welches als zweite Verschaltstelle der Hörbahn gilt (Webster und Garey 1990).

Der Ncl. olivaris superior, der *Leminiscus lateralis*, die *Colliculi inferiores* im Mittelhirn, der Ncl. *brachius colliculi inferiores* und das zum Thalamus gehörende *Corpus geniculatum mediale* sind aufeinanderfolgende Strukturen der Hörbahn (Webster und Garey 1990, Fitch et al. 1997) und weisen alle eine mehr oder weniger hohe Dichte an SHBG-haltigen Zellen sowie Fasern auf.

Als weitere sensorische Hirnnervenkerne enthalten die Ncll. vestibulares, der Ncl. *sensorius n. trigemini* und auch der Ncl. *tractus solitarii* SHBG in ihren Neuronen.

Auch Strukturen, die in der Verschaltung- und Koordination von sensorischen Afferenzen beteiligt sind, wie die *Colliculi superiores et inferiores* oder das *Periaqueduktale Grau* (PAG) (Andrezik und Beits 1985, Depaulis und Bandler 1991, Depaulis et al. 1992), zeigen sich in den Ergebnissen dieser Arbeit zumeist in Teilgebieten SHBG-positiv.

Erneut überlappen diese Gebiete nur teilweise mit Gebieten, in denen klassische ER nachgewiesen wurden.

Es ist bekannt, dass die Leistungsfähigkeit sensorischer Systeme sich in Abhängigkeit von systemischen Steroidspiegeln ändert (Jezierski und Sohrabji 2003). So ist z.B. bewiesen, dass ein erhöhter Estrogenspiegel zu einer Steigerung der Geruchsempfindlichkeit führt (Sanchez-Andrade et al. 2005). Auch die Aktivität der visuellen und somatosensorischen Hirnareale wird durch Estradiol beeinflusst (Antz-Vaxman und Aron 1986, Fink et al. 1996, Ohkura et al. 1997). Allerdings ist nur in Teilen des sensorischen Systems das Vorkommen von klassischen ER nachgewiesen (Mitra et al. 2003, Perez et al. 2003). Bis heute bleibt offen, durch welchen Mechanismus die Estrogene auf die übrigen sensorischen Gebiete wirken. Ein Hinweis könnte der Nachweis von SHBG in den betroffenen Gebieten sein.

Die deutlich selektive Anreicherung von SHBG in bestimmten Kerngebieten und Systemen lässt vermuten, dass das SHBG in diesen Teilgebieten eine Rolle bei der Vermittlung des Steroideffektes übernimmt. Weiterhin deutet die Präsenz von SHBG in zellulären Fortsätzen auf einen axonalen Transport des Proteins hin, wie er bereits für den Hypothalamus der Ratte beschrieben wurde (Herbert et al. 2006). Denkbar ist somit zum einen, dass SHBG als Neurotransmitter autonom Signale vermittelt oder aber als Neuromodulator die Effekte von bekannten Transmittern auf die Zelle reguliert.

Innerhalb der motorischen Hirnnervenkerne zeigen der Ncl. facialis sowie der Ncl. accessorius n. oculomotorii eine hohe Dichte an SHBG in ihren Neuronen. Der Ncl. n. vagus und der Ncl. ambiguus weisen SHBG in geringerer Dichte auf.

Während das Aufgabengebiet des Ncl. n. facialis die Innervation der mimischen Muskulatur ist, liegt die Zuständigkeit des Ncl. ambiguus in der motorischen Innervation des Gaumensegels, Schlundes und Kehlkopfes (Laine und Smoker 1998). Sowohl der Ncl. accessorius n. oculomotorii als auch der Ncl. vagus sind parasympathische Kernzentren. Der eine für die parasympathische Versorgung der inneren Augenmuskeln, der andere für die parasympathische Versorgung des gesamten Halses, Thorax' und Teilen des Abdomens zuständig (Daniels et al. 1998, Laine und Smoker 1998).

In diesen Kerngebieten überlappt das Vorkommen von SHBG nur in geringen Anteilen mit bekannter ER α -Lokalisation (Mitra et al. 2003, Perez et al. 2003). Der Einfluss von Estrogenen auf die motorische Artikulationsfähigkeit (Hampson 1990) könnte auch in diesem Bereich unter der Beteiligung von SHBG vermittelt werden.

Unter den sensiblen Hirnnervenkernen enthalten vor allem die zum Trigeminus gehörenden Kerngebiete SHBG.

Besonders hoch ist die Dichte im Ncl. mesencephalicus n. trigemini und im Ncl. principalis n. trigemini. Ihre Aufgabe liegt in der Vermittlung der propriozeptiven Sensibilität der Kaumuskulatur und der epikritischen Sensibilität des Gesichts (Dodd und Kelly 1991).

Klassische ER sind in diesem Gebiet nachgewiesen (Mitra et al. 2003), so dass die Estrogenwirkung hier durch ein Zusammenwirken von SHBG mit den ER erklärbar wäre.

Insgesamt fällt eine Häufung von SHBG in den Hirnnervenkernen auf, die das Gesicht und den Hals-Rachen-Raum motorisch sowie sensibel versorgen. In funktionellen Studien konnte sowohl eine Estrogen-bezogene Veränderung des motorischen Artikulationsvermögens (Hampson 1990) als auch ein positiver Effekt von Estrogenen auf verbale Fähigkeiten beobachtet werden (Kimura 1996).

Interessant wären nach diesen Beobachtungen in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit weitergehende Studien zu dem funktionellen Einfluss von SHBG (mit oder ohne Zusammenwirken von Estrogenen) auf Aktionen wie Mimik, Artikulationsvermögen oder Saugen.

Die FR koordiniert durch die Verschaltung der Hirnnervkerne die Aufrechterhaltung des lebensnotwendigen inneren Körpermilieus. Dies geschieht in verschiedenen funktionellen Zentren, die teilweise nicht klaren anatomischen Strukturen zugeordnet werden können (Langhorst et al. 1986, Ramirez und Richter 1996).

SHBG-Anhäufungen innerhalb der FR sind im Kerngebiet des Locus coeruleus und des Ncl. raphei magnus zu beobachten. Beide Kerne stehen in enger Verbindung mit dem LS und kommunizieren mit dem Rückenmark. Sie spielen eine Rolle bei der Entstehung des Schlaf-Wach-Rhythmus und im Zusammenspiel mit dem aufsteigenden, retikulären aktivierenden System bei der Entstehung von Angst und Stress (Graeff 1997, Grace et al. 1998).

Die Ncl. raphei sind dem serotonergen System zugehörig, welches in die Regulierung von diversen Funktionen wie Reproduktion, Stimmung, Schlaf und Wahrnehmung involviert ist (Lauder 1990) und unter regulatorischem Einfluss von Estrogenen steht (Biegon et al. 1980, Chomicka 1986).

Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist noch nicht erschlossen (McEwen und Alves 1999). Klassische ER konnten nur in einer Teilgruppe der serotonergen Zellen nachgewiesen werden (Alves et al. 1998).

Estrogenbindungsstellen wurden autoradiographisch bereits vor 30 Jahren in der FR beschrieben (Morrell et al. 1979). Immunzytochemische Studien zeigen das Vorkommen von ERs in Teilgebieten der FR (Alves et al. 1998), so dass in diesem Gebiet ein Zusammenwirken von SHBG und ER zu vermuten ist.

In der Substantia grisea periaqueductalis zeigen sich symmetrisch angeordnete, einzelne große Neurone mit weit verzweigten Projektionen, die eine deutliche Immunreaktivität für SHBG in ihrem Zytoplasma aufweisen. Sie sind am ventralen Rand des Colliculus superior angeordnet und ihre Gesamtanzahl beträgt zwischen 14 und 20. Die Morphologie dieser Nervenzellen ähnelt der im Prä-Bötzing-Komplex beschriebenen Neurone, welche im ventrolateralen Teil der FR lokalisiert werden (Smith et al. 1991). Dem Prä-Bötzing-Komplex wird eine Funktion bei der Generation des Atemrhythmus zugesprochen (Neusch et al. 2006). Der modulierende Einfluss von Serotonin auf die respiratorischen Motoneurone des Hirnstammes sowie das Vorkommen von Serotoninrezeptoren ist in Studien beschrieben worden (Schwarzacher et al. 2002, Richter et al. 2003, Manzke et al. 2003). Im dorsalen Anteil der FR, wie in dieser Arbeit gefunden, sind solche Neurone bis dato noch nicht beschrieben worden.

Auffällig erscheint die Häufung von SHBG in Strukturen, die unter serotinergem Einfluss stehen, wie bereits beim Ncl. raphe magnus beschrieben. Dies könnte ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen Serotonin und SHBG sein. Allerdings wären immunzytochemische Koloalisationsstudien und funktionelle Studien notwendig, um detailliertere Aussagen treffen zu können.

Als weitere SHBG-haltige Strukturen im Hirnstamm fallen die Kerngebiete auf, die an der Koordination der Motorik beteiligt sind. Auf Grund des engen funktionellen Zusammenhanges werden diese Gebiete in Kapitel 6.2.5 zusammen mit dem Cerebellum behandelt.

6.2.4 Cortex

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die von der Gruppe um Wang bereits 1990 (Wang et al. 1990) qualitativ beschriebene Präsenz von SHBG im Großhirn der Ratten auch im Gehirn der Maus.

Über den gesamten Cortex weisen die Pyramidenzellen des Stratum pyramidale externum sowie internum spezifisch einen hohen Gehalt an SHBG auf, während die restlichen Schichten keine Immunreaktivität zeigen. Funktionell sind die Pyramidenzellen die letzte Umschaltstelle im Cortex und senden als Projektionsneurone die im Cortex verarbeiteten Informationen an untergeordnete Strukturen weiter (Bannister 2005).

Klassische ER werden nur in mäßiger Dichte im Isocortex beobachtet (Perez et al. 2003).

Der Bulbus olfactorius gehört zur Riechbahn und beherbergt die erste Umschaltstellen der aus den primären Sinneszellen der Riechschleimhaut kommenden Informationen (Nieuwenhuys et al. 1991, Jones und Rog 1998). Er wird zum Allocortex gezählt und weist eine dem Neocortex ähnliche Gliederung in sechs Schichten auf.

SHBG-Immunoreaktivität zeigt sich deutlich in den Glomeruli olfactorii des Stratum glomerulosum, wo sich die afferenten Fasern der Riechzellen aufzweigen. Die Mitralzellen des Stratum mitrale enthalten ebenfalls SHBG. Sie fungieren als Projektionsneurone und verarbeiten afferente Informationen aus den Glomeruli, bevor sie diese über den Tractus olfactorius weiterleiten (Shipley und Ennis 1996).

In Mitralzellen sowie Periglomerularzellen des Menschen konnte SHBG ebenfalls immunzytochemisch nachgewiesen werden (Schäfer et al. 2006).

Es ist durch mehrere Studien bekannt, dass der systemische Estrogenspiegel die olfaktorischen Fähigkeiten beeinflusst (Okura et al. 1997, Sanchez-Andrade et al. 2005). Allerdings sind im Bulbus olfactorius immunozytochemisch keine ER α und nur teilweise ER β nachgewiesen (Mitra et al. 2003, Perez et al. 2003).

Der hohe Gehalt des SHBGs in den Afferenzen der olfaktorischen Sinneszellen sowie in den Mitralzellen lässt vermuten, dass es hier an der Vermittlung von Informationen entweder als selbstständiger Transmitter oder als Modulator bekannter Transmitter beteiligt ist.

Das Tuberculum olfactorium ist die folgende Umschaltstelle in der Riechbahn und wird ebenfalls zum Allocortex gezählt (Jones und Rog 1998). Anatomisch besteht es aus einer in Faserzügen eingelagerten Zellanhäufung, den Inseln von Calleja (Meyer et al. 1989). Diese gilt als Estrogen Target und weisen eine hohe Dichte an ER auf (Stumpf und Sar 1976).

Zellanhäufungen im Tuberculum olfactorium zeigen ebenfalls SHBG. Untersuchung zur Colokalisation in diesem Gebiet sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen nicht durchgeführt worden.

Das Vorkommen von ER α sowie SHBG lässt in diesem Bereich des Gehirns ein synergistisches Zusammenwirken beider Proteine vermuten.

6.2.5 Cerebellum

Das Cerebellum ist das wichtigste Integrationszentrum für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen (Bloedel et al. 1985). Es steht in enger Verbindung mit Strukturen in der Medulla oblongata, die ebenfalls an der Koordination von Bewegungsabläufen beteiligt sind (Gonzalo-Ruiz et al. 1988, Strata 1989). Anatomisch lässt sich das Kleinhirn in die Kleinhirnrinde und die Kleinhirnerne unterteilen (Ghez 1991).

Bereits Wang beschrieb 1990 SHBG im Cerebellum, ohne eine genauere Lokalisation zu definieren (Wang et al. 1990). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Identifizierung von SHBG im Kleinhirn und beschreiben die selektive Lokalisierung in verschiedenen Teilgebieten.

Innerhalb des Cortexes cerebellaris zeigten Zellkörper und Faserzüge in der Körnerzellschicht, bei denen es sich vermutlich um afferente Moosfasern aus praecerebellaren Strukturen handelt, einen hohen SHBG-Gehalt. Auch eine Teilklasse der Purkinjezellen ist - als einzige efferente Struktur der Kleinhirnrinde - angefärbt.

Unter den Kleinhirnerne weisen der Ncl. dentatus, der Ncl. fastigii und der Ncl. globosus eine hohe Dichte an SHBG-positiven Zellkörpern auf, während der Ncl. emboliformis weitgehend unauffällig erscheint.

Die Ncll. cerebellaris sind die einzig efferenten Systeme des Kleinhirns, die Afferenzen aus der Kleinhirnrinde verarbeiten und die Information an den Thalamus und Hirnstamm weiterleiten (Gonzalo-Ruiz et al. 1988, Horne und Butler 1995).

Auch in den Zielstrukturen der Kleinhirnefferenzen, wie dem Ncl. ruber, den Ncll. vestibulares und der Formation reticularis, sowie in den praecerebellaren Ursprungsregionen der Kleinhirnafferenzen, wie z.B. den Oliven, sind SHBG-Anhäufungen sowohl in Zellkörpern als auch in Faserzügen zu beobachten.

Es ist bekannt, dass der Estrogenspiegel die Motorik beeinflusst (McEwen und Alves 1999). Jedoch sind im Cerebellum keine klassischen ER α und nur wenige ER β immunozytochemisch nachgewiesen (Perez et al. 2003).

Aus Studien an für das Ratten-SHBG-Gen transgenen Mäusen geht hervor, dass auch SHBG einen Einfluss auf die Motorik ausübt. Die homozygoten transgenen Mäuse haben Defizite in

der Koordination von Bewegungen und leiden unter einem Ruhetremor (Reventos et al. 1993). Genauere funktionelle Studien zu diesen Phänomenen sind nicht bekannt.

Diese Beobachtungen weisen zusammen mit den morphologischen Ergebnissen dieser Arbeit darauf hin, dass das Steroid-bindende Protein eine entscheidende Funktion bei der Koordination der Motorik innerhalb des Kleinhirns ausübt.

Interessant erscheint hierbei, dass SHBG vermehrt in den efferenten Strukturen nachgewiesen werden konnte.

6.3 Colokalisation von SHBG mit ER α

Obwohl der Transport von Steroiden zunächst als einzige Funktion von SHBG galt, ist u.a. durch den Nachweis von verschiedenen Expressionsorten neben der Leber (Wang et al 1990, Fortunati 1999) seit längerer Zeit unumstritten, dass das Protein noch weitere Funktionen ausübt. Verschiedene Hypothesen sehen einen Zusammenhang zwischen der sogenannten nicht-genomischen schnellen Wirkungsweise von Steroiden und SHBG (McEwen und Alves 1999, Falkenstein et al. 2000). Andere Hypothesen schreiben SHBG eine eigenständige Wirkung über seinen eigenen membranständigen Rezeptor zu (Nakhla et al. 1999).

Vor diesem Hintergrund ist es interessant, ob SHBG mit den nukleären ER in denselben Zellen colokalisiert oder unabhängig von diesen in anderen Zellen vorkommt.

Für den Hypothalamus der Ratte ist eine Colokalisation von SHBG mit ER α für einen Teil der Zellen beschrieben worden (Jirikowski et al. 2003). Bis heute wurde allerdings keine detaillierte Colokalisationsstudie von SHBG und ER α für das gesamte Gehirn veröffentlicht.

Die Lokalisation von ER α im Mausgehirn ist aus mehreren Arbeiten bekannt (Lemmen et al. 1999, Mitra et al. 2003).

Ein Vergleich der Verteilung von ER α aus diesen Veröffentlichungen mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt auf den ersten Blick eine Überschneidung des Vorkommens beider Proteine in einigen, aber nicht in allen Hirnarealen.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Doppelfärbung allerdings zeigen, dass SHBG und ER α durchaus in denselben Hirnarealen vorkommen, aber bis auf ein einziges Kerngebiet nicht in denselben Zellen, sondern vielmehr in nebeneinander gelegenen Zellen lokalisiert sind.

Eine intrazelluläre Colokalisation von SHBG und ER α findet sich ausschließlich im Ncl. ventromedialis hypothalamii (VMH), was eine besondere Funktion dieses Kerngebietes im Zusammenhang von SHBG und Estrogenen vermuten lässt.

Der VMH ist wichtig für die Regulierung von Sexualverhalten, Essverhalten, Energiehaushalt sowie für kardiovaskuläre Funktionen (McClellan et al. 2006).

Ihm wird eine große Rolle im Rahmen der sexuellen Differenzierung des Gehirns unter Estrogeneinfluss zugeschrieben (Zhou et al. 2005).

Sa und Madeira (2005a) zeigten, dass sich sowohl der Geschlechtsunterschied als auch Schwankungen des Estrogengehalts im Laufe des Zyklus auch in Veränderungen der metabolischen Aktivität von Neuronen des ventrolateralen Anteils des VMH widerspiegeln.

Desweiteren wurde beschrieben, dass sich unter Estrogen-Behandlung die dendritischen Synapsen im VMH quantitativ verändern (Lewis et al. 1995, Sa und Madeira 2005b).

Der ventromediale Teil des VMH spielt eine essentielle Rolle für das Estrogen-induzierte Lordose-Verhalten bei weiblichen Ratten (Kow et al. 2005, Devidze et al. 2005).

Eine Studie an männlichen Ratten zeigte, dass eine Läsion des VMH zu Störungen des soziosexuellen Verhaltens der betroffenen Tiere führte (Harding und McGinnis 2005).

Der Einfluss des VMH auf die Nahrungsaufnahme ist bereits schon durch frühe Anatomen beschrieben worden. Allerdings ist die Bezeichnung des VMH als „Sättigungszentrum“ des Gehirns durch komplexere Erkenntnisse über molekulare Mechanismen in diesem Gebiet überholt (King 2006). Unbestritten bleibt hingegen, dass der VMH eine wichtige Rolle in dem komplexen, für die Regulation des Essverhaltens verantwortlichen, Strukturgefüge einnimmt (King 2006). Funktionell konnte gezeigt werden, dass Steroide Einfluss auf Nahrungsaufnahme und Essverhalten nehmen. So ist nachgewiesen, dass Estradiolbehandlung die Nahrungsmenge reduziert, in dem es die Wirkung sättigender Magenpeptide wie Cholezystokinin positiv beeinflusst (Geary 1998).

Zusammengefasst werden dem VMH multiple Funktionen zugewiesen, die zu einem großen Teil unter regulierendem Einfluss von Estrogenen stehen. In verschiedenen Teilgruppen sind klassische ERs nachgewiesen (McClellan et al. 2006, Devidze et al. 2005), wobei es auch als gesichert gilt, dass ein Teil der Estrogenwirkung über den nicht-genomischen Weg vermittelt wird (Vasudevan et al. 2005). Die Gruppe um Vasudevan (2005) beschreibt ein Modell, in

dem genomische und nicht-genomische Wirkungsweise der Estrogene innerhalb des VMH nebeneinander ablaufen und sogar in qualitativer Abhängigkeit stehen.

Besonders interessant erscheint vor diesem Hintergrund, dass in dieser Arbeit der VMH als einziges Kerngebiet mit intrazellulärer Colokalisation von SHBG und ERs beobachtet werden konnte. Diese selektive Colokalisation könnte ein Hinweis darauf sein, dass SHBG eine besondere Rolle bei der Integration der zwei Wirkungswege der Estrogene in diesem Kerngebiet einnimmt.

6.4 Überlegungen zum Wirkungsgefüge von SHBG und ER α im Gehirn

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ER α und SHBG mit der Ausnahme eines Kerngebietes nicht intrazellulär colokalisiert sind. Zumeist kommen beide Proteine in denselben Gebieten in benachbarten Zellen vor, allerdings gibt es auch Gebiete, in denen ausschließlich SHBG bzw. ER α beobachtet werden konnte.

Diese verschiedenen Verteilungsmuster legen nahe, dass verschiedene Arten des Zusammenspiels zwischen SHBG und ER α existieren.

Die Tatsache, dass SHBG zumeist alleine unabhängig von ER α intrazellulär nachgewiesen werden konnte, könnte für eine eigenständige Wirkung des SHBG sprechen. Es gibt Veröffentlichungen die besagen, dass SHBG einen autonomen G-gekoppelten Rezeptor besitzt und eigenständig als Neuromodulator, Transmitter oder als Neurohormon wirkt (Nakhla et al. 1999, Heinlein und Chang 2002, Caldwell et al. 2006).

Das Vorkommen von beiden Proteinen in nebeneinander gelegenen Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich zwar Zellen, aber nicht ganze Kerngebiete auf entweder das eine oder das andere Protein „spezialisieren“. Es erscheint möglich, dass es einen Synergismus beider Wirkmechanismen gibt. Zum einen eine nicht-genomisch vermittelte Wirkung durch SHBG und zum anderen die genomische Wirkung über die klassischen ER α . Es liegt die Vermutung nahe, dass sich beide Mechanismen zur Entwicklung der vollen Wirksamkeit der Steroide ergänzen. Auszuschließen ist dabei auch nicht, dass sich beide Systeme gegenseitig bedingen oder regulieren.

Ausgehend von der These, dass SHBG den so genannten nicht-genomischen Wirkungsweg von Steroiden beeinflusst, würde die hier festgestellte eindeutige zelluläre Trennung von SHBG und ER α dafür sprechen, dass der genomische und der nicht-genomische Wirkungsweg in verschiedenen Zellen ablaufen.

Auch in den Gebieten, wo funktionell der Einfluss von Estrogenen bewiesen ist, ohne dass klassische ERs gefunden werden konnten, wäre es möglich, dass SHBG über autonome Rezeptoren wirkt. Hier könnte die Anwesenheit von SHBG einen entscheidenden Hinweis zur Aufklärung der bis dato nicht geklärten Vermittlung der Hormonwirkung liefern. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde daher die Existenz eines membranständigen SHBG-Rezeptors postuliert (Hryb et al. 2002, Kahn et al. 2002, Caldwell et al. 2006).

Die in dieser Arbeit gefundene, ausschließlich in dem Kerngebiet vorkommende intrazelluläre Colokalisation von SHBG und ER α stellt eine dritte Konstellation des Vorkommens der beiden Proteine. Sie könnte für eine weitere Variante des Wirkungsgefüges von SHBG und ER α sprechen. So ist in Studien beschrieben, dass im Hypothalamus der SHBG-Spiegel unter dem regulierenden Einfluss von Estrogenen steht (Gao et al. 2003), und im Gebiet des VMH die nicht-genomische, schnelle Wirkweise der Estrogene die genomische, langsame Wirkweise beeinflusst (Vasudevan et al. 2005).

Vor diesem Hintergrund wäre es möglich, dass die Aufgabe von SHBG in den Zellen, in denen es mit ER α colokalisiert, in der Regulierung der genomischen Estrogenwirkweise besteht.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit drei Konstellationen des Vorkommens von SHBG und ER α beschrieben werden: unabhängig voneinander, in gleichen Kerngebieten, aber in verschiedenen Zellen und intrazelluläre Colokalisation.

Diese Vielfalt legt nahe, dass es auch verschiedene Wirkkonstellationen der beiden Proteine gibt. So ist es denkbar, dass sie sowohl autonom voneinander, als auch ergänzend in eine Art Synergie, als auch sich gegenseitig regulierend ihre Wirkung entfalten.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse nochmals die vielfältigen Funktionsweisen von SHBG, zu deren genauerer Bestimmung allerdings weitergehende Untersuchungen, sowohl morphologischer als auch funktioneller Natur, notwendig sind.

7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das erste Mal eine detaillierte Beschreibung der Lokalisation von SHBG im Mausgehirn. Sie beweisen, dass SHBG sowohl im motorischen, sensorischen und interneuronalen System als auch in neurosekretorischen Arealen vorkommt. Ebenfalls wird gezeigt, dass SHBG sowohl in Zellkörpern als auch in Zellausläufern lokalisiert ist.

Die Ergebnisse der Colokalisationsstudie für SHBG und ER a ergibt drei verschiedene Arten der Lokalisation beider Strukturen:

SHBG und ER treten unabhängig voneinander in verschiedenen anatomischen Strukturen auf.

SHBG und ER sind in identischen anatomischen Strukturen lokalisiert, kommen aber ausschließlich in verschiedenen Zellen vor.

SHBG und ER colokalisieren in denselben Zellen. Eine Verteilung, die in dieser Arbeit ausschließlich für den VMH beobachtet wurde.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt sich kein eindeutiger Schluss auf die funktionellen Eigenschaften von SHBG, sie deuten viel mehr daraufhin, dass SHBG multiple Funktionen im Gehirn innehat.

Sowohl das Vorkommen von SHBG unabhängig von ER in bestimmten Gebieten als auch der axonale Transport sprechen für eine weitreichend autonome Funktion des Binding Globulins als Neurotransmitter oder Hormon. Da das Verteilungsmuster von SHBG in Hypothalamus und Hypophyse dem bekannter Releasingfaktoren gleicht, ist auch eine Funktion als autonomer Releasingfaktor für SHBG in Betracht zu ziehen. SHBG als parakiner oder tophischer Faktor, der in Zusammenarbeit mit den klassischen ER wirkt, kann durch das Vorkommen von SHBG und ER in denselben anatomischen Strukturen erklärt werden.

Ein spezielles Wirkungsgefüge lässt die nur auf ein Kerngebiet limitierte Colokalisation von SHBG und ER in denselben Zellen vermuten.

Zur Aufklärung der Funktion von SHBG und dem Wirkungsgefüge von SHBG mit Steroiden sind weiterführende morphologische Colokalisationsstudien mit anderen Steroidrezeptoren und vor allem funktionelle Untersuchungen notwendig.

Für die klinische Praxis erscheint ein detailliertes Wissen über SHBG äußerst interessant, da sich hieraus ein weites Feld medikamentöser Interventionsmöglichkeiten bei verschiedenen Krankheitsbildern als Alternative zur bis dato angewandten Steroidtherapie ergeben könnte.

8 Literaturverzeichnis

- Alves SE, Weiland NG, Hayashi S, McEwen B. 1998. Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progestin receptors within the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 391:322-334.
- Amaral Dt, Insausti R. 1990. Hippocampal formation. In: Paxinos G, Hrsg. The human nervous system. San Diego-NewYork: Academic Press, 711-756.
- Anderson DC, Lasley BL, Risher RA, Shepherd JH, Newman L, Hendrickx AG. 1976. Transplacental gradients of sex-hormone-binding globulin in human and simian pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 5(6):657-669.
- Andreuzik JA, Beits AJ.1985. Reticular formation, central gray and related tegmental nuclei. In: Paxinos G, Hrsg. The Rat Nervous System. 2.Aufl. Sydney-Orlando-San Diego: Academic Press,1-28.
- Antz-Vaxman M, Aron C.1986. Olfactory environment and early mating behavior in the cyclic female rat. *Physiol Behav*, 38(2):241-245.
- Arancibia S, Rage F, Astier H, Tapia-Arancibia L. 1996. Neuro-endocrine and autonomous mechanism underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*, 64:257-267.
- Bannister AP. 2005. Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res*, 53(2): 95-103.
- Beato M, Chavez S, Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61(4):240-51.
- Biegón A, Bercovitz H, Samuel D. 1980. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Res* 187:221-225.
- Bleier R, Byne W.1985. Septum and hypothalamus. In: Paxinos, G. Hrsg. The rat nervous system. Sydney, San Diego: Academic Press, 87-118.
- Bloedel JR, Dichgans J, Precht W.1985. Cerebellar Functions. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- Bocchinfuso WP, Ma KL, Lee WM, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL.1992. Selective removal of glycolysation sites from sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *Endocrinology*, 131(5):2331-2336.
- Bocchinfuso WP, Hammond GL. 1994. Steroid-binding and dimerization domains of sex hormone-binding globulin partially overlap: Steroids and Ca^{2+} dimer formation. *Biochemistry*, 33(35):10622-10629.
- Bruesch SR. 1984. Anatomy of the human hypothalamus. In: Givens JR, Hrsg. The Hypothalamus. Chicago: Yearbook Medical Publishers, 1-6.

- Caldwell JD, Moe B, Hoang J, Nguyen T.2000. Sex hormone-binding globulin brain stimulates female sexual receptivity. *Brain Res*, 874(1):24-29.
- Caldwell JD.2001. Evidence of sex hormone-binding globulin binding sites in the medial preoptic area and hypothalamus. *Horm Metab Res*, 33(1):7-9.
- Caldwell JD, Song Y, Englöf I, Höfle S, Key M, Morris M.2003. 5a- Reduced androgens block estradiol-BSA-stimulated release of oxytocin. *Brain Res*, 976 (2):259-261.
- Caldwell JD, Suleman F, Chou SH, Shapiro RA, Herbert Z, Jirikowski GF. 2006. Emerging roles of steroid-binding globulins. *Horm Metab Res*, 38(4):206-218.
- Cato AC, Nestl A, Mink S. 2002. Rapid Action of Steroid Receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*, 25(138):RE9.
- Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P.2004.A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astorcytes. *Endocrinology*, 145(8):3788-95.
- Cheng CY, Musto NA, Gunsalus GL, Frick J, Bardin CW. 1985. There are two forms of androgen binding protein in human testes. Comparison of their prometric variants of serum testosterone-estradiol binding globulin. *J Biol Chem*, 260(9):5631-5640.
- Chomicka LK.1986. Effect of oestradiol on the responses of reffional brain serotonin to stresses in the ovariectomized rat. *J Neural Transm*, 67:267-273.
- Coote JH. 1995. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biological Signals* 4:142-149.
- Daniels DL, Mark LP, Ulmer J, Maas EF, Borne JA, Calderwood GW. 1998. Understanding the brain stem. *Neuroimaging Clin NAm*, 8(1):55-68.
- Danzo BJ, Black JH, Bell BW.1991. Analysis of the oligosaccharides on androgen-binding proteins: implications concerning their role in structure/function relationships. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40(4-6):821-831.
- Depaulis A, Bandler R, Hrsg. 1991.The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organisation. New York-London: Springer US-Verlag.
- Depaulis A, Keay KA, Bandler R. 1992. Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. *Exp Brain Res*, 90(2):307- 318.
- Devidze N, Mong JA, Jasnow AM, Kow LM, Pfaff DW. 2005. Sex and estrogenic effects on coexpression of mRNAs in single ventromedial hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40):14446-51.
- Dodd J, Kelly JP. 1991. Trigeminal system. In. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Hrsg. Principles of Neural science. New York- Amesterdam: Elsevier, 701-710.
- Douma SL, Husband C, O'donnell ME, Barwin BN, Woodend AK. 2005. Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors. *ANS Adv Nurs Sci*, 28(4):364-375.

- Ekelund L, Laurell CB.1994. The pregnancy zone protein response during gestation: a metabolic challenge. *Scand J Clin Lab Invest*, 54(8):623-629.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52(4):513-556.
- Feldman M, Lea OA, Petrusz P, Tres LL, Kierszenbaum AL, French FS. 1981.Androgen-binding protein. Purification from rat epididymis, characterization, and immunocytochemical localization. *J Biol Chem*, 256(10):5170-5175.
- Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP.1996. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol*, 16(3):325-344.
- Fitch RH, Miller S, Tallal P. 1997. Neurobiology of speech perception. *Ann Rev Neurosci*, 20:331-353.
- Fortunati N.1999. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest*, 22(3):223-234.
- Fortunati N, Catalano MG.2006. Sex hormone-binding globulin (SHBG) and estradiol cross-talk in breast cancer cells. *Horm Metab Res*, 38(4):236-40.
- Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD.2003. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology*, 78(2):61-71.
- Gasc JM.1981.Autoradiographic studies of steroid receptor sites in embryonic tissues. *J Histochem Cytochem*, 29(1A Suppl): 181-189.
- Geary N. 1998. The effect of estrogen on appetite. *Medscape Womens Health*, 3(6):3-3.
- Gershagen S, Fernlund P, Lundwall A.1987. A cDNA coding for human sex-hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett*, 220(1):129-135.
- Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. 1989. Characterization of human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res*, 17(22):9245-9257.
- Ghez C.1991. The cerebellum. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Hrsg. *Principles of Neural Science*. New York-Amsterdam: Elsevier, 626-646.
- Glass AR.1989.Endocrine aspects of obesity. *Med Clin North Am*, 73(1):139-160.
- Gonzalo-Ruiz A, Leichnetz GR, Smith DJ. 1988. Origin of cerebellar projections to the region of the oculomotor complex, medial pontine reticular formation and superior colliculus in new world monkeys: a retrograde horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 268:508-526.
- Grace AA, Gerefe CR, Aston-Jones G. 1998. Catechomamines in the central nervous system. *Adv Pharmacology* 42:655-670.

- Graeff FG. 1997. Serotonergic systems. *Psychiatric Clinics of North America*, 20:723-739.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 346(5):340-352.
- Hammond GL, Underhill DA, Ryske HM, Smith C. 1989. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol*, 3(11):1869-1876.
- Hammond GL. 1990. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocrine Rev* 11(1):65-79.
- Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1996. Sex hormone-binding globulin: Gene organization and structure/function analyses. *Horm Res*, 45(3-5):197-201.
- Hampson E. 1990. Estrogen-related variations in human spatial and articulatory-motor skills. *Psychoendocrinology*, 15: 97-111.
- Hansson V, Weddington SC, French FS, McLean W, Smith A, Nayfeh SN, Ritzen EM, Hagenas L. 1976. Secretion and role of androgen-binding proteins in the testis and epididymis. *J Reprod Fertil*, 24:17-33.
- Harding SM, McGinnis MY. 2005. Microlesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus: effects on sociosexual behaviors in male rats. *Behav Neurosci*, 119(5):1227-1234.
- Hardy DO, Carino C, Catterall JF, Larrea F. 1995. Molecular characterization of genetic variant of the steroid hormone-binding globulin gene in heterozygous subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(4):1253-1256.
- Heinlein CA, Chang C. 2002. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Protein in nongemomic androgen actions. *Molecular Endocrinology*, 16(10):2181-2187.
- Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englöf I, Caldwell JD. 2003. Distribution of androgen-binding protein in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system, co-localization with oxytocin. *Brain Research*, 992(2):151-158.
- Herbert Z, Gothe S, Caldwell JD, Bernstein HG, Melle C, von Eggeling F, Lewis J, Jirikowski GF. 2005. Identification of sex hormone-binding globulin in the human hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 81(5):287-293.
- Herbert Z, Pollák E, Molnár L, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2006. Co-Transport of sex hormone-binding globulin/SHBG with oxytocin in transport vesicle of the hypothalamo-hypophyseal system. *Horm Metab Res*, 38(4):291-293.
- Hildebrand C, Bocchinfuso WR, Dates D, Hammond GL. 1995. Resolution of steroid-binding dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in *Escherichia Coli*. *Biochemistry*, 34(10):3231-3238.
- Holstege G. 1987. Some anatomical observations on the projections from hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autoradiographic tracing study in cat. *J Comp Neurol*, 260:98-126.

- Horne MK, Butler EG. 1995. The role of the cerebello-thalamo-cortical pathway in skilled movement. *Progr Neurobiol*, 46:199-213.
- Hoskin EK, Tang MX, Manly JJ, Mayeux R. 2004. Elevated sex-hormone binding globulin in elderly women with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25(2):141-147.
- Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. 1990. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem*, 265(1):6048-6054.
- Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM, St George J, Levy NC, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector. *J Biol Chem*, 277(29):26618-26622.
- Janne M, Deol HK, Power SG, Yee SP, Hammond GL. 1998. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, 12(1):123-136.
- Janne M, Hogeveen KN, Deol HK, Hammand GL. 1999. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology*, 140(9):4166-4174.
- Jezierski MK, Sohrabji F. 2003. Estrogen enhances retrograde transport of brain-derived neurotrophic factor in the rodent forebrain. *Endocrinology* 144(11):5022-5029.
- Jirikowski GF, Merchenthaler I, Rieger GE, Stumpf WE. 1986. Estradiol target sites immunoreactive for β endorphin in the arcuate nucleus of rat and mouse hypothalamus. *Neuroscience Lett*. 65:121-126.
- Jirikowski GF, Winter A, Caldwell JD, Petrusz P, Herbert Z. 2003. Sex hormone-binding globulin (SHBG) is expressed in estrogen receptor alpha- and beta- immunoreactive neurons in rat hypothalamus. Society for Neuroscience. Washington, DC: online. Program No.610.2.
- Jirikowski GF, Herbert Z, Petrusz P, Sendemir E, Caldwell JD. 2005. Co-expression of vasopressin and androgen-binding protein in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat*, 29(4):233-237.
- Jones N, Rog D. 1998. Olfaction: a review. *J Laryngol Otol*, 112(1):11-24.
- Joseph DR, Hall SH, French FS. 1987. Rat androgen-binding protein. evidence for identical subunits and amino acid homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(2):339-343.
- Joseph DR, Adamson MC, Kozak CA. 1991. Genetic mapping of the gene of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin to mouse chromosome 11. *Cytogenet Cell Genet*, 56(2):122-124.
- Joseph DR, Baker ME. 1992. Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin, and Drosophila crumbs protein. *FASEB J*, 6(7):2477-2481.
- Joseph DR. 1994. Structure, function and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm*, 49:197-280.

- Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol*, 175(1):113-120.
- Kato T, Horton R. 1968. Studies of testosterone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 28(8):1160-1168.
- Khan MS, Hryb DJ, Hashim GA, Romas NA, Rosner W. 1990. Delineation and synthesis of the membrane receptor binding domain of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem*, 265(30):18362-18365.
- Kimura D. 1992. Sex differences in brain. *Sci Am*, 267:119-125.
- Kimura D. 1996. Sex, sexual orientation and sex hormone influence human cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*, 6(2):259-263.
- King BM. 2006. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87(2):221-244.
- Koch M, Ehret G. 1989. Immunocytochemical localization and quantitation of estrogen-binding cells in the male and female (virgin, pregnant, lactating) mouse brain. *Brain Res*, 489(1):101-112.
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M. 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, 15:2499-2513.
- Kompoliti K. 2003. Estrogen and Parkinson's disease. *Front Biosci*, 8:391-400.
- Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brein CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Robertson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104(5):719-730.
- Kow LM, Easton A, Pfaff DW. 2005. Acute estrogen potentiates excitatory responses of neurons in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Brain Res*, 1043(1-2):124-131.
- Krupenko SA, Krupenko NI, Danzo BJ. 1994. Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 51(1-2):115-124.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(12):5925-5930.
- Kumar R, Thompson EB. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 64(5):310-319.
- Lacourse A, Woods CE, Herndon JG. 2007. Effects of aging and hormonal status on bimanual motor coordination in the rhesus monkey. *Neurobiol Aging*, 28(2):186-193.
- Lai IC, Liao DL, Bai YM, Lin CC, Yu SC, Chen JY, Wang YC. 2002. Association study of the estrogen receptor polymorphisms with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 46(4):173-175.

- Laine FL, Smoker WRK. 1998. Anatomy of the cranial nerves. *Neuroimaging Clinics of North America*, 8:69-100.
- Lafamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C Rivest S. 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol*, 36:357-378.
- Langhorst P, Schulz G, Lambertz M. 1986. Physiological and pathophysiological aspects of the multifunctional system for arousal, somatomotor, cardio-vascular and respiratory regulation. In: Kunze, Zangenmeister WH, Arlt A, Hrsg. *Clinical Problems of Brain Stem Disorders*. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag, 162-169.
- Larriba S, Esteban C, Torà N, Gérard A, Audí L, Gérard H, Reventos J. 1995. Androgen Binding Protein is tissue-specifically expressed and biologically active in transgenic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53(1-6):573-578.
- Lauder JM. 1990. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci* 600:297-314.
- Lemmen JG, Broekhof JL, Kuiper GG, Gustafsson JA, van der Saag PT, van der Burg B. 1999. Expression of estrogen receptor α and β during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 81(1-2):163-167.
- Lewis C, McEwen BS, Frankfurt M. 1995. Estrogen-induction of dendritic spines in ventromedial hypothalamus and hippocampus: effects on neonatal aromatase blockade and adult GDX. *Brain Res*, 87(1):91-95.
- Lewis JG, Shand BI, Elder PA, Scott RS. 2004. Plasma sex hormone-binding globulin rather than corticosteroid-binding globulin is a marker of insulin resistance in obese adult males. *Diabetes Obes Metab*, 6(4):259-263.
- Lieberherr M, Grosse B. 1994. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem*, 269(10):7217-7223.
- Manzke T, Guenther U, Ponimaskin EG, Haller M, Dutschmann M, Schwarzacher S, Richter DW. 2003. 5-HT₄ receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science*, 301(5630):226-229.
- McClellan KM, Parker KL, Tobet S. 2006. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*. *Front Neuroendocrinol*, 27(2):193-209.
- McEwen BS, Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*, 20(3):279-307.
- McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. 1996. Involvement of the amygdale in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci*, 93:13508-13514.
- Meyer G, Gonzales-Hernandez T, Carrillo-Padilla F, Ferres-Torres R. 1989. Aggregations of granule cells in the basal forebrain (islands of Calleja): Golgi and cytoarchitectonic study in different mammals, including man. *J Comp Neurol*, 284(3):405-28.

- Miller AD, Leslie RA. 1994. The area postrema and vomiting. *Frontiers Neuroendocrinol*, 15:301-320.
- Mitra SW, Haskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer, SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. 2003. Immunolocalization of Estrogen Receptor β in the Mouse Brain: Comparison with Estrogen Receptor α . *Endocrinology*, 144(5):2055-2067.
- Moore RY. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. 1997. *Ann Rev Med*, 48:253-266.
- Moore FL, Evans SJ. 1999. Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence. *Brain Behav Evol*, 54(1):41-50.
- Morrell JI, Crews D, Ballin A, Morgentaler A, Pfaff DW. 1979. 3H-Estradiol, 3H-testosterone, 3H-dihydrotestosterone localization in the brain of lizard. *Anolis carolinensis*: an autoradiographic study. *J Comp Neurol*, 188:201-244.
- Morris JS, Öhmann A, Dolan RH. 1996. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala, *Nature* 393:467-470.
- Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. 1999. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G Protein. *Steroids*, 64(3):213-216.
- Neusch C, Papadopoulos N, Müller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Bahr M, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsman S. 2006. Lack of Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J Neurophysiol* 95(3):1843-1852.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huizen C. 1991. *Das Zentralnervensystem des Menschen*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
- Nieuwenhuys R. 1996. The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res*, 107:551-580.
- Nilsson S, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*, 2(5):360-366.
- Okura S, Fabre-Nys C, Broad KD, Kendrick KM. 1997. Sex hormones enhance the impact of male sensory cues on both primary and association cortical components of visual and olfactory processing pathways as well as in limbic and hypothalamic regions in female sheep. *Neuroscience*, 80(1):285-97.
- O'Mara S. 2005. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat*, 207(3):271-282.
- Pappas TC, Gametchu B, Yannariello-Brown J, Collins TJ, Watson CS. 1994. Membrane estrogen receptors in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin. *Endocrine*, 2:813-822.
- Paxinos G, Franklin KB. 2003. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Zweite Aufl. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press.

- Perez SE, Chen EY, Mufson EJ. 2003. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Developmental Brain Research* 145(1):117-139.
- Petrusz P. 2002. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. 5.Aufl. New York: John Wiley & Sons, Inc. 200-202, 2898-2900.
- Pfaff DW, Keiner M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol*, 151:121-158.
- Pfaff DW, Gerlach JL, McEwen BS, Ferin M, Carmel P, Zimmermann EA. 1976. Autoradiographic localization of hormone-concentrating cells in the brain of female rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 170(3):279-293.
- Pike AC. 2006. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20(1):1-14.
- Pratt WB, Toft DO. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, 18(3):306-360.
- Pugeat M, Cousin P, Baret C, Lejeune H, Forest MG. 2000. Sex hormone-binding globulin during puberty in normal and hyperandrogenic girls. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13(5):1277-1279.
- Ramirez JM, Richter DW. 1996. The neuronal control of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol*, 6: 17-825.
- Reventos J, Sullivan PM, Joseph DR, Gordon JW. 1993. Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 96(1-2):69-73.
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E. 2003. Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med*, 9(12):542-548.
- Risold PY, Thompson RH, Swanson LW. 1997. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res Rev*, 24:197-254.
- Rosenbaum W, Christy NP, Kelly WG. 1966. Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 26(12):1399-1403.
- Rosner W. 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocrine Rev*, 11(1):80-91.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69(1-6):481-5.
- Ruigrok TJ. 1997. Cerebellar nuclei: the olivary connection. *Progress in Brain Research*, 114: 167-192.

- Sa SI, Madeira MD. 2005a. Neuronal organelles and nuclear pores of hypothalamic ventromedial neurons are sexually dimorphic and change during the estrus cycle in rat. *Neuroscience*, 133(4):19-24.
- Sa SI, Madeira MD. 2005b. Estrogen modulates the sexually dimorphic synaptic connectivity of the ventromedial nucleus. *J Comp Neurol*, 484(1):68-79.
- Saenz C, Dominguez R, de Lacalle S. 2005. Estrogen contributes to structural recovery after a lesion. *Neurosci Lett*, 16;392(3):198-201.
- Sanchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM. 2005. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev*, 51(5):547-558.
- Sar M, Parikh I. 1986. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem*, 24(2):497-503.
- Schäfer H, Doetsch J, Herbert Z, Jirikowski GF. 2006. Localization of Arg-Vasopressin and Sex Hormone binding globulin SHBG in the human olfactory bulb. *FENS Abstr*, 3, A008.27.
- Schwarzacher SW, Pestean A, Gunter S, Ballanyi K. 2002. Serotonergic modulation of respiratory motoneurons and interneurons in brainstem slices of perinatal rats. *Neuroscience*, 115(4):1247-1259.
- Selby C. 1990. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. *Ann Clin Biochem*, 27(6):532-541.
- Selva DM, Hogeveen KN, Seguchi K, Tekpetey F, Hammond GL. 2002. A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis. *J Biol Chem*, 277(47):45291-45298.
- Selye H. 1941. Variations in organ size caused by chronic treatment with adrenal cortical compounds: An example of a dissociated adaptation to a hormone. *J Anat*, 76:94-99.
- Sherwin BB. 1994. Estrogenic effects on memory in women. *Ann NY Acad Sci*, 743:213-231.
- Shipley MT, Ennis M. 1996. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol*, 30(1):123-76.
- Shugrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 388:507-525.
- Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW. 1994. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Spargue-Dawley rats. *Brain Res*, 644:30-312.
- Sitoh YY, Tien RD. 1997. The limbic system. An overview of the anatomy and its development. *Neuroimaging Clin N Am*, 7(1):1-10.

- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. 1991. Pre-botzinger complex – a brain-stem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254(5032):726-729.
- Smith OA, DeVito JL. 1984. Central neural integration for the control of autonomic responses associated with emotion. *Ann Rev Neurosci*, 7: 43-65.
- Strata P. 1989. The olivocerebellar system in motor control. Berlin-Heidelberg-Paris: Springer-Verlag.
- Strel'chyonok OA, Accakumov GV, Survilo LI. 1984. A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochem Biophys Acta*, 802(3):459-466.
- Stumpf WE, Sar M, Keefer DA. 1975. Atlas of estrogen target cells in rat brain. In: Stumpf WE, Grant LD, Hrsg. *Anatomical Neuroendocrinology*. Basel: Karger-Verlag, 104-119.
- Stumpf WE, Sar M. 1976. Steroid hormone target sites in the brain: the differential distribution of estrogen, progesterin, androgen and glucocorticosteroid. *J Steroid Biochem*, 7:1163-1170.
- Stumpf WE, Narbaitz R, Sar M. 1980. Estrogen receptors in the fetal mouse. *J Steroid Biochem*, 12:55-64.
- Stumpf WE, Jennes L. 1984. The A-B-C (Allocortex-Brainstem-Core) circuitry of endocrine-autonomic integration and regulation: a proposed hypothesis on the anatomical-functional relationships between estradiol sites of action and peptidergic-aminergic neuronal systems. *Peptides*, 5(Suppl 1):221-226.
- Sullivan PM, Petrusz P, Szpirer C, Joseph DR. 1991. Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal rat liver. Identification of a transcript formed by trans splicing. *J Biol Chem*, 266(1):143-154.
- Sullivan PM, Wang Y, Joseph DR. 1993. Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/ sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of messenger RNA encoding a protein with altered function. *Mol Endocrinol*, 7(5):702-715.
- Sutter-Dub MT. 2002. Rapid non-genomic and genomic responses to progestagens, estrogens and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids*, 67(2):77-93.
- Suzuki Y, Sinohara H. 1987. Subunit structure of sex-steroid binding plasma proteins from man, cattle, dog and rabbit. *J Biochem*, 96: 751-753.
- Swaab DF. 1997. Neurobiology and neuropathology of the human hypothalamus. In: Bloom FE, Björklund A, Hökfelt T, Hrsg. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. 13. Aufl. Amsterdam-NewYork: Elsevier, 39-138.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 19(14):5792-5801.

- Thompson RF, Kim JJ. 1996. Memory system in the brain and localisation of a memory. *Proc Natl Acad Sci*, 93:13438-13444.
- Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG. 1998. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*, 10(3):373-383.
- Vasudevan N, Kow LM, Pfaff D. 2005. Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in brain. *Steroids*, 70(5-7):38-396.
- Vermeulen A, Kaufman JM, Giagulli VA. 1996. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(5):1821-1826.
- Wang YM, Bayliss DA, Milhorn DE, Petrusz P, Joeseph DR.1990. The androgen-binding protein gene is expressed in the male and female rat brain. *Endocrinol*, 127(6):3124-3130.
- Webster WR, Garey LJ. 1990. Auditory system. In:Paxinos G, Hrsg. *The Human Nervous System*. Sandiego-New York: Academic Press, 889-944.
- Welsh JP, Llinas R. 1997. Some organizing principles of the control movement based on the olivocerebellar physiology. *Progress in Brain Research*, 114:449-461.
- Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their roles in non-genomic mechanism. *Life Sci*, 67(7):743-757.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280:1378-1383.
- Zhao L, O'neill K, Diaz Brinton R. 2005. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Brain Res Rev*, 49(3):472-493.
- Zhou J, Pfaff DW, Chen G. 2005. Sex differences in estrogenic regulation of neuronal activity in neonatal cultures of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(41):14907-14912.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anika Winter
Anschrift: Nollendorfer Str. 13
07743 Jena
Geburtsdatum: 07.04.1978
Geburtsort: Northeim
Familienstand: verheiratet
Kinder: 3 (Titus 2,5 Jahre, Mattis und Lale 6 Monate)

Schulausbildung:

1984 – 1988 Grundschole Gieboldehausen
1988 – 1990 Orientierungsstufe Gieboldehausen
1990 – 1994 Eichsfeld Gymnasium Duderstadt
1994 – 1995 Robinson High School in Illinois, USA
1995 – 1997 Eichsfeld Gymnasium Duderstadt

Studium:

1999 – 2006 Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2000 Praktikum in einer Poliklinik in Havanna, Kuba
2001 Famulatur in der Kardiologie im Klinikum Weimar
2001 Praktikum in der Universitätsklinik in Temuco, Chile
2002 Famulatur in der Universitätsklinik in Maputo, Mosambik
seit Februar 2003 wissenschaftliche Arbeit am Institut für Anatomie der FSU Jena
2003 – 2004 Forschungsaufenthalt an der University of Chapel Hill, NC,
USA als Stipendiatin der Böhlinger Ingelheim Stiftung
2004 Famulatur in der Neuropädiatrie der Universitätsklinik Jena
2005 Famulatur in einer allgemeinmedizinischen Praxis in
Gieboldehausen

2005 – 2006

Praktisches Jahr

1. Tertial: Kinderchirurgie FSU Jena,
2. Tertial: Innere Medizin Thüringen-Kliniken Rudolstadt
3. Tertial: Pädiatrie FSU Jena

November 2006

Abschluss des Studiums: Staatsexamen mit der Gesamtnote 2,16

Sonstige Aktivitäten:

1997 – 1999

Dienst für Frieden und Versöhnung in La Paz, Bolivien

1999 – 2003

Mitarbeit im Bundesfacharbeitskreis für Entwicklungsfragen der
Deutschen Pfadfinderschaft Sankt Georg

2000 – 2002

Stipendiatin der Melton Foundation

2000 – 2003

Gründung der Studentengruppe „Ethik in der Medizin“ sowie
Gestaltung von Ethikseminaren an der FSU Jena

2004

Tutor im Institut für Anatomie der FSU Jena

Fremdsprachen:

Englisch und Spanisch: sehr gut in Wort und Schrift

Französisch: Grundkenntnisse

Jena 31.07.2007

Anika Winter

10 Danksagung

Herzlichen Dank!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G.F. Jirikowski bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat, diese Promotionsarbeit in seiner Abteilung zu erstellen. Er war jederzeit zur Hilfestellung bereit und für Fragen und Probleme stets ansprechbar. Für verschiedenste Belastungssituation im Privaten oder Studium zeigte er großes Verständnis und schaffte es gleichzeitig in Zeiten des Zweifels die Motivation neu zu entfachen.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Zofia Herbert, die mir angefangen mit der Einweisung in die Labormethoden bis zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit stets mit Rat und Tat sehr hilfreich zur Seite stand.

Danken möchte ich Prof. Peter Petrusz, der mir einen Forschungsaufenthalt in seinem Labor an der University of Chapel Hill, North Carolina und somit die Erhebung meiner Daten ermöglichte.

Besonderen Dank gilt in diesem Rahmen der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Gail Grossmann, die mich vor Ort sehr herzlich betreute und begleitete.

Danke an die Böhlinger Ingelheimstiftung, die mir durch die Gewährung eines Travel Allowance Grants meinen Forschungsaufenthalt erst möglich machte.

Rene Krieg und Hermann Winter danke ich für das hilfreiche Lektorat und Formatierung dieser Arbeit.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch allen hier nicht genannten, die zu dieser Arbeit durch Hilfe, Rat oder Verständnis beigetragen haben.

Danken möchte ich speziell meinem Ehemann Bernd Bode sowie meinen Kindern Titus, Mattis und Lale Winter für das außergewöhnliche Maß an Verständnis, die fortwährende Motivation und vielfältige Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Anika Winter

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. G.F. Jirikowski, Dr. Z. Herbert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena 31.07.2007

Anika Winter